

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de inmunosenescencia y longevidad : posibles
estrategias para mejorar la calidad de vida en el
envejecimiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Lorena Arranz Salas

DIRECTOR:

Mónica de la, dir Fuente del Rey

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



T612.67

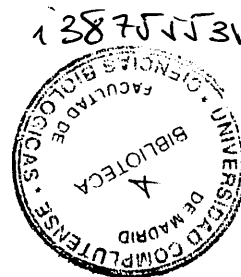
ARR
mec

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**MECANISMOS DE
INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.
POSIBLES ESTRATEGIAS
PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA
EN EL ENVEJECIMIENTO.**



Memoria presentada por Lorena Arranz Salas
para obtener el Grado de Doctora con Mención Europea en Biología

Madrid 2009

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología
(Fisiología Animal II) de la Facultad de Biología de la Universidad
Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Mónica De la Fuente
(Catedrática)

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos BFU2005-06777 y SAF2006-13642 del Ministerio de Educación y Ciencia, SEC2000-0712 del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, del grupo UCM-CM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) (Nº 910379), de ZAMBÓN S.A. – PHARMAZAM S.A. (Italia – España) (Nº8/2004), de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (ISCIII), y BFU2008-04336 del Ministerio de Ciencia e Innovación, y con la concesión a Lorena Arranz de un contrato de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado"*

Albert Szent-Györgi

"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas"

Albert Einstein

Ahora, a punto de cerrar la última página de este gran capítulo de mi vida, siento el alma rebosante de emociones. Tristeza; los finales siempre son tristes, por ser finales. Satisfacción; por encontrarme aquí y lo que eso supone, el largo camino recorrido y los obstáculos superados. Entusiasmo; por las puertas que se abren. Inquietud; por escoger la mía. Y agradecimiento. Son muchas las personas que me han apoyado, y que directa o indirectamente han ayudado a la consecución de esta tesis y a que yo me encuentre aquí. Me siento muy agradecida a todas ellas, y me gustaría mencionar especialmente a algunas, ya que a todas sería imposible.

Muchas gracias, Mónica, desde lo más profundo de mi corazón, gracias. Gracias por confiar en aquella niña inexperta e insegura, en sus posibilidades. Gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo mi sueño, por darme alas. He aprendido mucho a tu lado, y sabes que te admiro y te respeto, como científica y como persona. Sólo espero que tú también te sientas orgullosa de esta tesis y de mí. Hemos pasado muchos momentos juntas, altos y bajos, sonrisas y lágrimas, y siempre has estado ahí. Me has devuelto la motivación en los momentos oscuros. Me has tendido tu mano cuando lo he necesitado. Y sobre todo... me has dado alas. El cariño y el agradecimiento que siento hacia ti son para siempre.

Gracias mamá y papá, por estar siempre, por darme todo lo que ha estado en vuestras manos para ayudarme a ir en busca de mis sueños, a veces incluso en contra de vuestro propio bienestar, por educarme en el reto y la superación, por no haber puesto barrera a mis inquietudes nunca. Por creer en mí. Os quiero. Os dedico mi tesis a vosotros, que os lo merecéis todo.

No puedo olvidarme de otros grandes científicos con los que he tenido la gran suerte de poder trabajar de manera muy cercana, Reinald Pamplona, Suresh Rattan y Janet Lord, que me brindaron la posibilidad de hacer posible buena parte de esta tesis y de vivir experiencias únicas a nivel no sólo profesional, sino también personal. Hago el agradecimiento extensible a sus equipos y colaboradores, en especial a Alba Naudí, Peter Kristensen, John S. Curnow y Jorge Caamaño.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio que me habéis echado una mano en los momentos álgidos de experimentación, Nuria, Ianire, Isabel, Noelia, Pedro, Marta, Oskarina, Julio, Mateo, Clara. Gracias a Sonia por unas cuantas conversaciones interesantes en torno a la ciencia. Gracias también a Paz Viveros, con la que he podido colaborar en varias ocasiones, y a su equipo, especialmente a Eva Marco y Claustro Zambrana por su ayuda. Gracias a Lydia Giménez-Llort; a Manuel Muñoz y Aída de Vicente; a José Manuel Ribera, Cesáreo Fernández y Antonio Rodríguez; a León Siboni; y al Dr. Fernández Tresguerres, que nos prestó desinteresadamente sus instalaciones cuando nos vimos obligados a detener nuestra actividad en la Facultad de Biología.

Gracias a los grandes amigos que me he llevado de mis estancias, en Dinamarca, mi "hermana" Karen y su familia, Cristovao, Regina, Michael; en Inglaterra, Sian, Graham, Diana, Oscar; y en Nueva York, Avital, Silvia, Yair y Jose. Con todos ellos he vivido momentos muy especiales y los han hecho inolvidables. Gracias a la Dra. Eva Hernando, por permitirme adentrarme en el apasionante mundo de los miRNAs, el cáncer y las células madre, y completar así mi formación, y a todo su equipo, en especial a Miguel Segura.

Gracias a los amigos del Departamento: Pilar, Ricardo, Teresa, Álvaro. Gracias Julia por iluminar hasta los días más grises con tu alegría y tu risa. Gracias Fernando, no te hemos olvidado. Gracias en general a todo el Departamento de Fisiología, a mis amigos y a mi familia. Gracias Alberto. Tenías razón, todo llega. Ya está aquí...

¡Muchísimas gracias a todos!

*A mis padres,
con todo mi amor.*

ABREVIATURAS

A β	Péptido amiloide A β
AASA	Semialdehído aminoadípico
ACL	Longitud media de cadena
ACTH	Hormona adenocorticotropa
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APP	Proteína precursora amiloide
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosintrifosfato
BCR	Receptor de las células B
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
CCR	Receptor de quimioquinas CC
CD	Antígeno de diferenciación
CEL	N ^ε -(carboxietil)-lisina
CML	N ^ε -(carboximetil)-lisina
ConA	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)
CRF	Factor liberador de corticotropina
Cu	Cobre
DBI	Índice de dobles enlaces
DC	Célula dendrítica
DHEA	Dehidroepiandrosterona
EA	Enriquecimiento ambiental
ENDORF	Endorfinas
ESTROG	Estrógenos
Fc	Fragmento cristizable de las inmunoglobulinas
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GC	Glucocorticoides
GC/MS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GH	Hormona del crecimiento
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GPx	Glutation peroxidasa

GR	Glutation reductasa
GSA	Semialdehído glutámico
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HLA	Antígeno leucocitario humano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
HT	Hormonas tiroideas
5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
KC	Quimioquina derivada de queratinocitos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LPS	Lipopolisacárido (de la membrana de <i>E.coli</i>)
LT	Leucotrieno
Mac	Macrófago
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDA	Malondialdehído
MDAL	N ^ε -(malondialdehído)-lisina
MEL	Melatonina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
fMLP	Péptido formilado (f-Met-Leu-Phe)
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NA	Noradrenalina
NAC	N-acetilcisteína
N-CAM	Molécula de adhesión de la célula neural
NEM	N-etilmaleimida
NFκB	Factor nuclear κ B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico

NPY	Neuropéptido Y
NTg	No transgénico
$O_2^{\bullet -}$	Anión superóxido
OH^{\bullet}	Radical hidroxilo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución tamponada de fosfatos
PG	Prostaglandina
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Índice de peroxidizabilidad
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PRL	Prolactina
PS	Presenilina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RANTES	Expresado y secretado por células T normales, y regulado por activación
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAMP	Ratones con propensión a senectud acelerada
SFA	Ácidos grasos saturados
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
3xTgAD	Triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
TGF	Factor de crecimiento tumoral
Th	Célula T helper (colaboradora)
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tr	Células T reguladoras
UFA	Ácidos grasos insaturados
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XO	Xantina oxidasa

ÍNDICE

RESUMEN.....	27
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUCCIÓN.....	43
1.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.....	43
1.1.1. El Envejecimiento y sus características.....	43
1.1.2. El cómo, el dónde y el porqué del envejecimiento. Necesidad de una teoría integradora para explicar el envejecimiento.....	44
1.1.3. Papel del sistema inmunitario en el envejecimiento. La teoría de oxidación-inflamación.....	50
1.1.3.1 La inmunosenescencia. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica.....	51
1.1.3.2. El sistema inmunitario como predictor de longevidad.....	65
1.1.3.3. El estrés oxidativo, la inmunosenescencia y la longevidad.....	70
1.1.3.4. La comunicación neuro-inmuno-endocrina en el envejecimiento y la pérdida de la homeostasis.....	75
1.1.4. Papel del sistema inmunitario en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento: la enfermedad de Alzheimer.....	87
1.2. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.....	92
1.2.1. La suplementación con antioxidantes.....	93
1.2.2. El enriquecimiento ambiental.....	100
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	104
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	113
3.1. MATERIAL.....	113
3.1.1. Material biológico.....	113
3.1.1.1. Animales.....	113
3.1.1.2. Humanos.....	113
3.1.1.3. Líneas celulares.....	114
3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas.....	114
3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura.....	114
3.1.2.2. Medios comerciales.....	114
3.1.3. Reactivos y kits comerciales.....	115
3.1.4. Material de laboratorio.....	118
3.1.5. Aparataje.....	119
3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y MÉTODOS.....	120

3.2.1. Animales de experimentación: ratones.....	120
3.2.1.1. Protocolos experimentales en ratones.....	120
3.2.1.1.1. Caracterización de ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico.....	120
3.2.1.1.2. Efecto del aislamiento social sobre diversas funciones de linfocitos esplénicos y tímicos, así como sobre el contenido en glutatión de esas células durante la vejez en ratones hembras..	121
3.2.1.1.3. Estudio de los cambios inmunoendocrinos en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	122
3.2.1.1.4. Efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario y nervioso a lo largo del envejecimiento.....	123
3.2.1.1.5. Efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario y endocrino en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	124
3.2.1.2. Métodos experimentales en ratones.....	125
3.2.1.2.1. Estudio conductual.....	125
3.2.1.2.2. Obtención de las muestras biológicas en ratones.....	130
3.2.1.2.3. Análisis de las subpoblaciones celulares presentes en las suspensiones peritoneales, y de la expresión en su membrana de receptores Toll 2 y 4.....	132
3.2.1.2.4. Estudio de funciones inmunitarias.....	133
3.2.1.2.5. Estudio de los niveles de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos.....	140
3.2.1.2.6. Estudio del estrés oxidativo a nivel de compuestos oxidantes y antioxidantes en leucocitos peritoneales.....	143
3.2.1.2.7. Estudio de la activación del factor nuclear de transcripción κ B (NF κ B) en extractos nucleares de leucocitos peritoneales.....	150
3.2.1.2.8. Estudio de la apoptosis en leucocitos peritoneales.....	152
3.2.1.2.9. Estudio de la morfología cerebral.....	153
3.2.1.2.10. Profundización en el estrés oxidativo a nivel de proteínas y lípidos en los sistemas inmunitario y nervioso.....	154
3.2.1.2.11. Estudio de la función endocrina. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	162
3.2.1.2.12. Análisis estadístico.....	163
3.2.2. Humanos.....	164
3.2.2.1. Protocolos experimentales en humanos.	164
3.2.2.1.1. Estudio del efecto de la ansiedad crónica y de la situación de estrés psicosocial por ausencia de hogar como modelos de envejecimiento prematuro en humanos.	164
3.2.2.1.2. Estudio del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre la funcionalidad y el estrés oxidativo de leucocitos de sangre periférica en mujeres postmenopáusicas.....	172

3.2.2.2. Métodos en muestras humanas de sangre periférica.....	176
3.2.2.2.1. Obtención de leucocitos y plasma de sangre periférica. Recuento y viabilidad celular.....	176
3.2.2.2.2. Estudio de funciones inmunitarias.....	178
3.2.2.2.3. Estudio de los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos.....	181
3.2.2.2.4. Estudio del daño oxidativo a lípidos y de los niveles de compuestos antioxidantes en leucocitos y plasma de sangre periférica.....	183
3.2.2.2.5. Estudio de la función endocrina. Niveles plasmáticos de cortisol.....	186
3.2.2.2.6. Análisis estadístico.....	186
4. RESULTADOS.....	191
4.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.....	191
4.1.1. Envejecimiento cronológico.	191
4.1.1.1. Cambios con la edad en las poblaciones, funcionalidad y estrés oxidativo de células peritoneales en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.	191
4.1.1.1.1. Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b, CD11c.....	191
4.1.1.1.2. Capacidad funcional de los leucocitos.....	193
4.1.1.1.3. Estrés oxidativo e inflamatorio en los leucocitos.....	200
4.1.1.1.4. Apoptosis.....	221
4.1.1.2. Estudio neurológico en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.....	221
4.1.1.3. Profundización en los cambios con la edad en el daño oxidativo a proteínas y análisis de la composición de ácidos grasos, en ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos.....	223
4.1.1.3.1. Biomarcadores de oxidación proteica.....	223
4.1.1.3.2. Análisis de la composición en ácidos grasos procedentes de los lípidos totales.....	227
4.1.1.3.3. Actividad del proteasoma 20S.....	231
4.1.2. Envejecimiento prematuro: mujeres con ansiedad, estrés en personas sin hogar, y aislamiento social en ratones viejos hembras.....	237
4.1.2.1. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y en los niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol en mujeres con ansiedad.....	237
4.1.2.1.1. Neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	237
4.1.2.1.2. Linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	239
4.1.2.1.3. Citoquinas: Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α	239
4.1.2.1.4. Niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.....	239
4.1.2.2. Efecto del estrés en personas sin hogar sobre la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y sobre los niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.....	242

41.2.2.1. Neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	242
41.2.2.2. Linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	242
41.2.2.3. Citoquinas: Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α	245
41.2.2.4. Niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.....	245
41.2.3. Efecto del aislamiento social durante la vejez sobre el deterioro asociado a la edad en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones muy viejos C57BL/129Sv hembras.....	246
41.2.3.1. Función linfocitaria: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	246
41.2.3.2. Citoquinas: Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α	248
41.2.3.3. Defensa antioxidante: Niveles intralinfocitarios de glutatión total.....	249
41.2.3.4. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	250
41.3. Envejecimiento patológico: Modelo murino para la enfermedad de Alzheimer. Cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad.....	250
41.3.1. Función linfocitaria: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	250
41.3.2. Citoquinas: Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α	256
41.3.2. Defensa antioxidante: Niveles intralinfocitarios de glutatión total.....	258
41.3.3. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	259
42. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.....	261
42.1. Antioxidantes: Efecto de la N-acetilcisteína sobre la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y el estado redox en mujeres postmenopáusicas.....	261
42.1.1. Capacidad funcional de los leucocitos.....	261
42.1.1.1. Neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	261
42.1.1.2. Linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	265
42.1.1.3. Citoquinas: Interleuquina 2, factor de necrosis tumoral α e interleuquina 8.....	268
42.1.2. Estado redox de leucocitos y plasma.....	271
42.1.2.1. Defensa antioxidante: Niveles de glutatión total en linfocitos, neutrófilos y plasma.....	271
42.1.2.2. Marcador de daño oxidativo: Niveles plasmáticos de malondialdehído.....	272
42.2. Intervención psicológica: Ambiente enriquecido.....	275
42.2.1. Efecto del ambiente enriquecido en el deterioro inmunitario, conductual y cognitivo asociado a la edad en ratones hembras ICR/CD1 adultos y viejos.....	275
42.2.1.1. Estudio inmunológico en leucocitos peritoneales.....	275

4.2.2.1.2. Estudio neurológico.....	293
4.2.2.1.3. Estudio conductual.....	295
4.2.2.1.4. Longevidad.....	306
4.2.2.2. Efecto del ambiente enriquecido en los cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad.....	308
4.2.2.2.1. Función linfocitaria: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	308
4.2.2.2.2. Citoquinas: Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α	314
4.2.2.2.3. Defensa antioxidante: Niveles intralinfocitarios de glutatión total.....	317
4.2.2.2.4. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	319
5. DISCUSIÓN.....	323
5.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.....	323
5.1.1. Envejecimiento cronológico: Caracterización de ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico.....	323
5.1.1.1. Cambios con la edad en las poblaciones, la funcionalidad y el estrés oxidativo e inflamatorio, así como en la activación del factor de transcripción NF κ B, en los leucocitos peritoneales a lo largo del envejecimiento, en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.....	323
5.1.1.2. Neuroimagen por resonancia magnética en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.....	341
5.1.1.3. Profundización en el daño oxidativo inmunitario y cerebral a proteínas, así como en la susceptibilidad a la oxidación lipídica y su relación con la composición en ácidos grasos, en ratones hembras BALB/c adultos, viejos, y longevos.....	344
5.1.2. Envejecimiento prematuro: Ansiedad crónica en mujeres, estrés psicosocial en personas sin hogar, y aislamiento social en la vejez de ratones hembras.....	354
5.1.2.1. Cambios en la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica, y en los niveles de antioxidantes y de cortisol plasmáticos, en mujeres con ansiedad.....	354
5.1.2.2. Efecto de la situación de estrés psicosocial en personas sin hogar sobre diversas funciones de los leucocitos de sangre periférica, y sobre los niveles de antioxidantes y de cortisol plasmáticos.....	361
5.1.2.3. Efecto del aislamiento social durante la vejez en diversas funciones y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, así como sobre los niveles de corticosterona plasmática, en ratones muy viejos C57BL/129Sv hembras.....	367
5.1.3. Envejecimiento patológico: Modelo murino para la enfermedad de Alzheimer. Cambios inmunitarios, a nivel de diversas funciones y del contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y	

tímicos, así como en la concentración de corticosterona plasmática, en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	371
5.2. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.....	378
5.2.1. La suplementación con antioxidantes: Efecto de la N-acetilcisteína sobre la funcionalidad y el estado redox de los leucocitos de sangre periférica en mujeres postmenopáusicas.....	378
5.2.2. Intervención psicológica: Ambiente enriquecido.....	387
5.2.2.1. Efecto del ambiente enriquecido en el deterioro inmunitario, conductual y cerebral asociado a la edad, en ratones hembras ICR/CD1 adultos y viejos. Incidencia sobre la longevidad.....	387
5.2.2.2. Efecto del ambiente enriquecido en los cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en la concentración de corticosterona plasmática, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad.....	394
6. CONCLUSIONES.....	401
<i>CONCLUSIONS</i>	407
7. REFERENCIAS.....	413
ANEXO.....	467

Resumen

**MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.
POSIBLES ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL
ENVEJECIMIENTO.**

La teoría de envejecimiento que goza actualmente de mayor aceptación es la teoría de la oxidación por los radicales libres que se producen en la necesaria utilización celular del oxígeno. Según ésta, el proceso de envejecimiento se inicia en las mitocondrias de células diferenciadas, tales como las neuronas. Por otra parte, estudios recientes proponen un papel clave del sistema inmunológico, no como base del envejecimiento, sino como sistema que puede modificar la tasa a la que éste se produce. Así, la inflamación y el estrés oxidativo que generan los leucocitos a lo largo de la vida del individuo, en su papel defensivo frente a lo extraño, si no están bien regulados, no sólo participan en la inmunosenescencia, también contribuyen a la aceleración del envejecimiento y determinan la pérdida de la salud que lleva a la muerte prematura. Además, en base a las interacciones existentes entre los sistemas reguladores, el nervioso, endocrino e inmunitario, las alteraciones en uno o más de estos sistemas y en la comunicación entre ellos, tienen como resultado la mayoría de las disfunciones fisiológicas asociadas al envejecimiento, a través del agravamiento de la pérdida homeostática. En este contexto, es de gran interés el estudio de los sistemas reguladores en individuos que han alcanzado una longevidad próxima a la máxima de su especie. Investigaciones recientes han descrito ciertos parámetros inmunitarios como marcadores de salud y longevidad, puesto que aparecen preservados en centenarios, mientras que el deterioro de los mismos se ha asociado a mayor edad biológica, morbilidad y mortalidad, y en determinados casos también a la presencia y/o gravedad de enfermedades neurodegenerativas. No obstante, la mayoría de estudios en centenarios se han centrado en uno o pocos parámetros, perdiéndose el contexto de globalidad. Esta limitación puede eludirse mediante el uso de animales de experimentación longevos, pero los trabajos a nivel del sistema inmunitario en longevos han sido muy escasos hasta la fecha. Por ello, en la actualidad apenas se conocen los mecanismos que subyacen al mantenimiento de la funcionalidad inmunológica en estos animales, pero tampoco es bien conocida la oxidación-inflamación y la pérdida funcional que se da con la edad en los individuos viejos.

En los experimentos que conforman la presente tesis doctoral se estudiaron ratones hembras de diferentes edades, incluyendo adultos, viejos y longevos. Los animales longevos habían superado ampliamente la esperanza de vida media de los ratones en nuestro animalario, mientras que la edad de los viejos se correspondía con aquélla en la que el pico de mortalidad es más elevado. Los resultados confirman que una amplia variedad de respuestas funcionales de las células inmunitarias se encuentra preservada en los ratones longevos y marcadamente deteriorada en los viejos. Es el caso de la actividad NK, la quimiotaxis y fagocitosis de macrófagos, la quimiotaxis y proliferación en respuesta a concanavalina A (ConA) de linfocitos, así como la respuesta de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (IL-1 α / β , 3, 6 y 12, IFN- γ , TNF- α , e IL-4, 10 y 13) a los

mirógenos ConA y LPS. Los niveles de factores de crecimiento y citoquinas reguladoras (IL-2, 5, 17 y VEGF) en esos mismos cultivos están también mejor conservados en longevos que en viejos. No obstante, ciertos parámetros inmunitarios parecen mostrarse menos relevantes para alcanzar la longevidad, como es el caso de los niveles de diversas quimioquinas (KC, MCP-1, MIP-1 β y RANTES).

Los longevos muestran también un declive en la respuesta proliferativa a LPS y elevada expresión de TLR-2 y TLR-4 en las células B. Este deterioro de la proliferación inducida por LPS es más marcado en los viejos, pero la expresión de TLRs en las células B de estos individuos no se encuentra aumentada significativamente en comparación con los adultos. Los viejos muestran sin embargo un incremento muy marcado en la expresión de TLRs por parte de las células CD8⁺, y especialmente de las células CD4⁺ junto al declive dramático de la proliferación inducida por ConA, mientras que todos estos parámetros se mantienen preservados en los longevos. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las células B son las primeramente afectadas por la inmunosenescencia en los longevos, en contraste con lo que sucede en los viejos, en los que las células T serían las células de la inmunidad adaptativa alteradas en primer lugar por el envejecimiento, contribuyendo al declive funcional de las células B.

La oxidación crónica en las células inmunitarias de viejos quedó demostrada al comprobarse los elevados niveles basales de glutatión oxidado y de actividad xantina oxidasa, y disminuidos de glutatión reducido (GSH), y de las actividades enzimáticas glutatión peroxidasa y catalasa que presentan las mismas. Los animales viejos sufren además una inflamación crónica, como refleja el aumento en los niveles basales de citoquinas proinflamatorias, tales como las interleuquinas 1 β , 3, 6 y 12, el IFN- γ y el TNF- α , y disminuidos de antiinflamatorias, como la IL-10. Sin embargo, una elevada actividad catalasa basal intraleucocitaria junto con niveles intensificados de IL-10 que controlan la inflamación en reposo, se muestran como mecanismos clave en la prevención de la oxidación-inflamación crónica asociada a la edad, que no existe en los longevos. Así, los elevados niveles en esos parámetros parecen asociarse con una mayor esperanza de vida y por tanto pueden apuntarse como marcadores de longevidad. Además, los resultados de la presente tesis demuestran que una activación controlada del factor de transcripción NF κ B en el núcleo de los leucocitos en reposo es crucial para el mantenimiento de un ambiente basal reductor y antiinflamatorio, que permite la adecuada respuesta inmunitaria de los individuos longevos. En los viejos, un exceso de activación de este factor de transcripción se relaciona con el aumento de la oxidación-inflamación crónica y el deterioro funcional de sus leucocitos. Es más, en el grupo de viejos, sólo alcanzaron la longevidad aquellos individuos que mostraron una activación controlada de NF κ B en sus leucocitos, lo que apoya aún más el papel clave de este factor de transcripción en el envejecimiento y la longevidad.

En lo que respecta al cerebro de los animales que alcanzan la longevidad, también se producen atrofia y cambios morfológicos, pero las zonas en que éstos se inician son distintas con

respecto a los individuos viejos. La corteza entorrinal es el área cerebral primeramente afectada en éstos, mientras que el deterioro cerebral en longevos comienza en la corteza somatosensorial.

Los longevos muestran niveles de oxidación proteica similares a los adultos, tanto en el sistema nervioso como en el inmunitario, que se encuentran aumentados en viejos, especialmente en cerebro. Sin embargo, la idea de que el control de todos los marcadores de oxidación en una u otra localización conduce a la prolongación de la longevidad es errónea. En este sentido, el aumento de MDAL destaca como marcador universal de daño oxidativo a proteínas en el envejecimiento, mientras que bajos niveles de AASA en cerebro se muestran como marcadores de longevidad. Además, los resultados no muestran una disminución consistente en las actividades quimi tripsina y caspasa del proteasoma 20S, por lo que los cambios en las mismas y los niveles de daño oxidativo a proteínas no se encuentran directamente relacionados en términos de envejecimiento y longevidad. También, el estudio de la susceptibilidad lipídica a la oxidación mostró que unos valores bajos de índice de dobles enlaces, de índice de peroxidizabilidad así como de la longitud de la cadena de los ácidos grasos en cerebro son marcadores de longevidad intraespecie en ratón, y se corresponden con una fracción disminuida de ácidos grasos poli-insaturados. Del mismo modo que en el caso del daño oxidativo a proteínas, la idea de que el control de todos los ácidos grasos muy insaturados conduce a la prolongación de la longevidad es incorrecta. En concreto, unos valores bajos de ácido docosapentanoico de la serie 6 en cerebro destacan como marcadores de longevidad. Por otra parte, un mayor contenido en docosahexanoico y menor de linoleico se muestran como marcadores universales de envejecimiento.

En base a la comunicación entre los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino, nuestro grupo ha podido comprobar en estudios previos que los ratones que muestran un exceso de reactividad al estrés y una ansiedad crónica, sufren una inmunosenescencia prematura, apreciada en diversas funciones inmunitarias. Estos animales muestran también un mayor estrés oxidativo, que resulta en un acelerado envejecimiento fisiológico de los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario, lo que les lleva a una muerte prematura. De los resultados obtenidos en la presente tesis, puede concluirse que la ansiedad y el estrés crónicos, en humanos, la primera condición se estudió en mujeres que padecen ansiedad crónica y la segunda en personas con estrés psicosocial por ausencia de hogar, conducen al deterioro acelerado de estos mismos parámetros inmunitarios. Esto confirma a ambos colectivos (personas con ansiedad y estrés crónico) como modelos de envejecimiento prematuro en humanos.

Por otra parte, es bien sabido que la pérdida de la homeostasis con la edad lleva asociada una menor resistencia al estrés. Además, el aislamiento social es una condición frecuente en nuestros mayores, y especialmente entre las mujeres, dada su mayor esperanza de vida. Por ello, en la presente tesis se desarrolló un modelo de aislamiento social en la vejez en ratones hembras. Los resultados obtenidos demuestran que el aislamiento social exagera el deterioro inmunoendocrino asociado a la edad, produciendo un fuerte impacto en los niveles de corticosterona, en una serie de

funciones inmunitarias, así como en el contenido intraleucocitario del antioxidante más potente que presenta el organismo, el GSH. Todo ello a pesar de haber mantenido esos animales una vida social normal durante las etapas vitales previas a la vejez.

En relación al envejecimiento patológico, el Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en las sociedades actuales. Estudios recientes han mostrado que varias funciones del sistema inmunitario periférico que cambian con la edad, tales como la actividad fagocítica y la respuesta proinflamatoria, se encuentran más deterioradas en individuos con esta enfermedad, lo que contribuye a su desarrollo y/o curso. De este modo, los sujetos con Alzheimer podrían mostrar cambios inmunológicos asociados al envejecimiento más marcados en comparación con los individuos sanos de la misma edad. No obstante, existe cierta controversia en los estudios realizados en humanos, mayoritariamente relacionada con la dificultad para mantener estrictos criterios de inclusión entre los participantes, mientras que el bajo número de éstos no ha permitido por el momento explorar las posibles diferencias en función del género. Por tanto, en la presente tesis se estudiaron una serie de funciones y el contenido en GSH de células del sistema inmunitario periférico, así como los niveles de corticosterona, en ratones machos y hembras viejos triples transgénicos (*PS1_{M146V}*, *APP_{Swe}* y *tau_{P301L}*) para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD). En la cepa de ratón salvaje C57BL/129Sv, de la que se obtuvo el 3xTgAD (NTg) se analizaron esos mismos parámetros para comprobar el efecto del envejecimiento y el género en los mismos y relacionarlos con el estado de los animales 3xTgAD, utilizando ratones machos y hembras adultos y viejos. Los resultados muestran que la inmunosenescencia sistémica y el deterioro de la red inmunoendocrina, que se da con la edad, se encuentra acelerada y más pronunciada en los animales viejos 3xTgAD. Además, la mayor mortalidad observada en los machos 3xTgAD se relaciona con la mayor vulnerabilidad de la red inmunoendocrina que presentan los animales de este género.

Entre las posibles intervenciones al proceso de envejecimiento, la suplementación con cantidades apropiadas de antioxidantes es una estrategia potencialmente útil en el contexto de las teorías de los radicales libres y de la oxidación-inflamación del envejecimiento. En concreto, los precursores de GSH y en especial la N-acetilcisteína (NAC), se han mostrado eficaces en la protección del organismo frente al estrés oxidativo, ayudando a preservar la función de los sistemas reguladores y por tanto mantener la salud, y aumentando la esperanza de vida media en roedores. Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que la administración de NAC (600 mg/día) a mujeres postmenopáusicas es una estrategia eficaz, incluso en tratamientos cortos (2-4 meses) y a edades avanzadas (mayores de 70 años), para mejorar de manera prolongada el deterioro funcional de las defensas inmunológicas asociado a la edad y disminuir el estrés oxidativo. Estos efectos son coincidentes con el aumento de los disminuidos niveles de GSH en el interior de los leucocitos. Además, se comprobó que la determinación del GSH plasmático no es un marcador adecuado para conocer el nivel de este antioxidante en el organismo, puesto que, debido a su síntesis intracelular, puede no relacionarse con el que está presente en otras localizaciones, como

son las células inmunitarias circulantes en sangre periférica, sin duda una muestra de mayor significado biológico que el plasma.

Por otra parte, el enriquecimiento ambiental (EA) supone una aproximación experimental en modelos animales al mantenimiento de una vida social, intelectual y física activa en humanos. Son muchos los estudios que han demostrado los beneficios del EA a lo largo del envejecimiento revirtiendo el deterioro neurológico, cognitivo y conductual que se produce con la edad. También, estudios recientes han demostrado el beneficio de un EA en la reducción del desarrollo de la patología cerebral y en la mejora de la cognición así como de las conductas, como por ejemplo aquéllas relacionadas con la ansiedad, en diferentes modelos murinos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer. No obstante, los estudios que relacionan el EA con el sistema inmunitario a lo largo de la edad son muy escasos, e inexistentes en el caso de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como es el Alzheimer.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que la exposición de ratones de distintas edades a un ambiente rico en actividades intelectuales y físicas produce una importante mejora conductual, neurológica e inmunitaria a lo largo de envejecimiento. Esta mejoría es más marcada en los individuos de edades más avanzadas, en los que el declive asociado a la edad es mayor. Además, el establecimiento temprano de un EA y su mantenimiento hasta los últimos momentos, no sólo aumenta la salud en base a dichos parámetros sino también la esperanza de vida media de los individuos. En el caso del estudio en el modelo murino para la enfermedad de Alzheimer, el deterioro de la red inmunoendocrina es menor en los animales 3xTgAD que han vivido en un ambiente rico en actividades intelectuales y físicas que en los no enriquecidos de su misma condición, incluso tiempo después de haberles sido retirado el mismo. Este efecto beneficioso se observa especialmente en el grupo de machos, que son los que sufren de forma más marcada el declive inmunoendocrino asociado a la enfermedad. No obstante, los animales no transgénicos, y en especial las hembras, se muestran susceptibles a la retirada del ambiente enriquecido, presentando un deterioro mayor al mostrado por las hembras control en algunos marcadores clave del sistema inmunoendocrino.

En conclusión, una adecuada función inmunitaria es esencial para alcanzar la longevidad con buen estado de salud. Sencillas estrategias como mantener una vida social, intelectual y física activa, controlar los niveles de estrés, o el aporte de precursores de antioxidantes endógenos tienen un fuerte impacto sobre la misma, ayudando a envejecer saludablemente y/o contribuyendo a aumentar la calidad de vida en la vejez.

Palabras clave: Envejecimiento, Longevidad, Sistema Inmunitario, Oxidación-Inflamación, Ansiedad, Aislamiento Social, Alzheimer, N-acetilcisteína, Enriquecimiento Ambiental.

Abstract

MECHANISMS OF IMMUNE-SENESCENCE AND LONGEVITY. POSSIBLE STRATEGIES TO IMPROVE THE QUALITY OF LIFE WITH AGEING.

The free radical theory of ageing is one of the most accepted theories that better explains the ageing process, according to which, ageing is the result of oxidation by free radicals produced in necessary oxygen consumption. Thus, the ageing process starts in mitochondria of differentiated cells, such as neurons. Moreover, immune cells are important sources of endogenous oxidative-inflammatory compounds, and recent studies support a key role for the immune system, not as base of the ageing process, but as system that importantly influences its rate. Inflammation and oxidative stress generated by leucocytes throughout life, aiming to defend the organism against pathogens, when not perfectly regulated, participate not only in immune-senescence but also in physiological ageing, accelerating the process, and leading to health loss which results in premature death. Moreover, given the close interactions among regulatory systems, the immune, nervous and endocrine systems, alterations in one or more can lead to disruption of their communication, resulting in the great majority of age-related physiological dysfunctions, based on worsening of homeostatic loss. In this context, it is of great interest to study these regulatory systems in individuals that have achieved a longevity close to the maximum of their species. Over the last decade, a number of scientific studies have focussed on immune system in human centenarians. This research has described a variety of immune markers of health and longevity, which are preserved in centenarians, whereas deterioration of those parameters has been related to increased biological age, morbidity and mortality, and in some cases to presence and/or severity of neurodegenerative processes. However, most studies on centenarians have focussed on one or few parameters, losing the overall context. This limitation can be avoided by use of long-lived animals, but research on these animals has been very scarce so far. Thus, to date, mechanisms underlying maintenance of immune functions in longevity are poorly understood, but nor are the reasons for oxidation-inflammation and functional loss in the elderly.

Thus, in the present doctoral thesis, female mice of different ages, including adult, old and very long-lived, were used. Very long-lived animals had clearly survived over the mean life span of mice in our animal house, whereas the age of old animals corresponded with the highest age-related mortality rate. The results confirmed that a wide variety of peritoneal immune cell functions are preserved in long-lived mice, whereas they are markedly deteriorated in old animals. This is the case of NK activity, macrophage chemotaxis and phagocytosis, as well as lymphocyte chemotaxis and concanavaline A (ConA)-induced proliferation. In addition, we show that the pro- and anti-inflammatory cytokine (IL-1 α / β , 3, 6 and 12, IFN- γ , TNF- α ; and IL-4, 10, 13) responses to ConA and LPS in leucocytes from long-lived animals are adult-like, whereas they show an important decline in old subjects. Levels of growth factors and regulatory cytokines (IL-2, 5 and 17, VEGF) are also better preserved in long-lived than in old animals. However, alterations in certain immune

parameters seem to be less relevant in longevity achievement, since old and long-lived subjects show similar changes. This is the case of several chemokine levels (KC, MCP-1, MIP-1 β , RANTES).

Long-lived animals also show decreased LPS-induced proliferation and increased membrane expression of TLR-2 and TLR-4 on B cells. This decline in LPS-stimulated proliferation is more marked in old subjects, but membrane expression of TLRs on B cells is not increased as compared to the adults. Conversely, a strong increase in TLRs expression on CD8 $^{+}$ cells, and especially on CD4 $^{+}$ cells together with the dramatic decline in ConA-induced proliferation is found in leucocytes from old subjects, whereas all these are maintained in the long-lived. Thus, our results suggest that B cells are primarily affected by immune-senescence in the long-lived, in contrast to old individuals, in which T would be the first cells from the adaptive immunity altered by ageing, contributing to the functional decline in B cells.

Chronic oxidation in immune cells from old subjects is demonstrated in our results by increased levels of oxidized glutathione and xanthine oxidase activity, and decreased values of reduced glutathione (GSH), and glutathione peroxidase and catalase activities. In addition, chronic inflammation in leucocytes from old animals is shown by increased levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , 3, 6 and 12, IFN- γ , and TNF- α , and decreased levels of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, in resting leucocyte culture supernatants. In contrast, high basal catalase activity together with intensified levels of IL-10 in resting leucocytes, stand out as key mechanisms preventing the age-related chronic oxidative-inflammatory process, which is not found in long-lived. High values of both parameters seem to be associated with increased life span, and therefore can be pointed out as longevity markers. In addition, the results obtained in the present thesis demonstrate that controlled activation of the transcription factor NF κ B in nuclei from leucocytes in resting conditions is crucial for maintenance of this reducing and anti-inflammatory environment, which allows the adequate immune response in the long-lived. However, in old individuals, an excess of NF κ B activation was found, which is related to the increased chronic oxidation-inflammation and the functional decline of leucocytes. Moreover, among old animals, only those showing controlled activation of NF κ B in leucocytes achieved longevity, further supporting the key role played by this transcription factor in ageing and longevity.

As regards morphological age-related changes in brain, long-lived animals also show atrophy and morphological deterioration, but regions where these changes start are different with respect to old subjects. Entorhinal cortex is the brain region primary affected in the old, whereas cerebral decline in the long-lived initiates in somatosensory cortex.

In addition, long-lived animals show protein oxidative damage marker levels in brain and spleen similar to the adults, which are increased in old subjects, especially as regards brain. However, according to our results, the idea that controlling every oxidation marker in one or the other location leads to extended life span is not correct, and thus one type of damage is more

relevant to another in terms of ageing and longevity. In this respect, increased levels of MDAL stand out as overall markers of protein oxidative damage with ageing, whereas decreased levels of AASA in brain can be regarded as a longevity marker. Furthermore, our results do not show a consistent age-related decline in chymotrypsin or caspase-like activities of 20S proteasome, thus changes in those activities do not directly map protein oxidative damage as regards ageing and longevity. In addition, the results on lipid susceptibility to oxidation show that low brain values of Double Bound Index, Peroxidizability Index and Average Chain Length are intra-species longevity markers in mice, and correspond with a diminished poly-unsaturated fatty acid fraction. However, similarly to protein oxidative damage, the idea that controlling every highly unsaturated fatty acid results in prolonged longevity is wrong. More concretely, low brain levels of docosapentanoic acid series 6 stand out as longevity markers. Besides, higher content of docosahexanoic and diminished content of linoleic can be pointed out as overall ageing markers.

Based on the communication among immune, nervous and endocrine systems, our research group has found, in previous studies, that mice showing increased reactivity to stress and chronic anxiety, also exhibit premature immune-senescence as regards several immune parameters. Moreover, these animals show increased oxidative stress, which results in accelerated physiological ageing of the nervous, endocrine and immune systems, leading to their premature death. The results obtained in the present thesis show that chronic anxiety and stress in humans lead to accelerated deterioration of the same immune parameters. The first condition studied was in women who suffered chronic anxiety as determined by the Beck Anxiety Inventory, and the second disturbance in people with psychosocial stress due to their homelessness. Thus, both chronic anxiety and stress are confirmed as models of premature ageing in humans.

Furthermore, age-related loss of homeostasis is associated with reduced capacity to adapt to stressful emotional situations. Moreover, social isolation is a frequent condition in aged humans, and especially among women, due to their longer life span. Thus, in the present PhD project, we developed a model of social isolation during old age in female mice. The results obtained show that social isolation from old to very old age intensifies the age-related immune-endocrine decline, causing a great impact on corticosterone levels, and on several immune functions as well as on the intracellular levels in leucocytes of the most powerful antioxidant present in the organism, the GSH. All this is in spite of a normal previous social life.

As regards pathological ageing, Alzheimer's disease is the most frequent neurodegenerative disease in current societies. Recent studies have found that several functions of the peripheral immune system that change throughout the ageing process, such as the phagocytic capacity and proinflammatory response, show increased deterioration in individuals who suffer from this disease, which contribute to its development and/or course. Thus, patients with Alzheimer's disease could show a premature ageing as compared to healthy elderly subjects of the same age. Nevertheless, controversial results have been described in humans, mostly related to difficulty in keeping strict

inclusion criteria among participants, whereas their low numbers have not made it possible so far to explore for gender differences. Research has provided extremely valuable animal models, which allow avoidance of these limitations. Among those, the triple transgenic mice (3xTgAD) model developed in the Irvine University of California stands out. These animals harbour the *PS1*_{M146V}, *A^{2P}_{Swe}* y *tau*_{P301L} transgenes, and mimic the neuropathology of the human brain with Alzheimer, in the relevant regions of the disease and in an age-dependent manner. Thus, in the present thesis we studied several functions and GSH content of cells from peripheral immune system, as well as plasma corticosterone, on female and male 3xTgAD old mice. On the wild type C57BL/129Sv mice (NTg), from which 3xTgAD mice were obtained, we analyzed the same parameters aiming to determine the effect of ageing and gender, and relate them to the status of 3xTgAD animals. Thus, we also used female and male adult and old NTg mice. The results show that systemic immunosenescence and age-related decline of immune-endocrine network is accelerated and more pronounced in old 3xTgAD animals. In addition, the increased mortality rate observed in 3xTgAD males is related to the increased vulnerability of the immune-endocrine network that male animals show.

Among the possible interventions in the ageing process, supplementation with adequate amounts of antioxidants is a potentially useful strategy in the context of the free radical and oxidative-inflammatory theories of ageing. More specifically, GSH precursors and especially N-acetylcysteine (NAC), have been shown to be efficient in protecting the organism against oxidative stress, helping preserve the function of the regulatory systems, and thus health, and increasing average life span in mice. The results obtained in the present thesis show that NAC administration (600 mg/day) to postmenopausal women is an effective strategy, even in short-term treatments (2-4 months) and at advanced ages (women over 70 years), leading to extended improvement of immune responses and decreased oxidative stress. These effects are coincident with the increase of the age-related diminished GSH levels in peripheral leucocytes. In addition, we show that determination of plasma GSH is not an adequate marker to know the levels of this antioxidant in the body, as it can be unrelated to the levels in other locations, such as peripheral lymphocytes and neutrophils, due to its major intracellular synthesis.

Environmental enrichment (EE) represents an experimental approach in animal models to maintenance of an active social, intellectual and physical life in humans. A variety of studies have demonstrated beneficial effects of EE throughout the ageing process, reversing the age-related neurologic, cognitive and behavioural decline. In addition, recent studies have shown the benefits of EE in reducing the development of brain pathology and improving cognition and behaviours, such as those related to anxiety, on different transgenic models for Alzheimer's disease in rodents. However, research on the possible effects of EE on the immune system with ageing is scarce. In addition, this field has not been explored so far in the case of age-related neurodegenerative diseases, such as Alzheimer.

The results obtained in the present thesis demonstrate that mice of different ages exposed to an environment rich in mental and physical activities show significant improvements in a great variety of immune parameters, behaviour and brain atrophy. This improvement is more marked in animals at advanced ages, in which the age-related decline of those parameters is greater. In addition, early establishment of EE and its maintenance until death, not only improves the quality of life in terms of those markers, but also increases the average life span of the subjects. The study of the effects of EE in the murine model for Alzheimer's disease show that deterioration of immune-endocrine network is lower in old 3xTgAD animals that have been exposed to an EE since adulthood, compared to non-enriched animals of the same condition, even after its removal. This beneficial effect is observed especially in the male group, which shows the most marked immune-endocrine deterioration. However, NTg animals, and especially the female group, seem to be susceptible to EE removal, exhibiting a greater decline in several key immune-endocrine markers as regards non-enriched NTg females.

In conclusion, adequate function of the immune system is essential in achieving longevity with good health. Easy strategies, such as maintenance of an active social, mental and physical life, control of stress levels, or supplementation with precursors of endogenous antioxidants, cause a great impact on the immune function, helping healthy ageing and/or contributing to improved quality of life in the elderly.

Key words: Ageing, Longevity, Immune System, Oxidation-Inflammation, Anxiety, Social Isolation, Alzheimer, N-acetylcysteine, Environmental Enrichment.

Introducción

1.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.

1.1.1. El envejecimiento y sus características.

El aumento en la esperanza de vida media de las poblaciones de los países desarrollados, que en la actualidad ronda los 75-83 años, ha dado lugar a un interés generalizado por conocer cuáles son los mecanismos que nos hacen envejecer y finalmente morir. En este sentido, el interés del estudio de estos procesos en aquellos individuos que alcanzan edades extremas es de indudable.

Para comprender el papel del sistema inmunitario en el proceso de envejecimiento es necesario primeramente conocer algunos conceptos básicos sobre este proceso. El envejecimiento puede ser definido como el deterioro progresivo y generalizado de las funciones del organismo, que conduce a una menor capacidad de adaptación a los cambios y de mantenimiento de la homeostasis. Esta acumulación de cambios adversos con la edad aumenta el riesgo de enfermedad y finalmente resulta en la muerte del individuo. De esa forma, a pesar de que el envejecimiento no es una enfermedad en sí mismo, sí que se encuentra fuertemente asociado al padecimiento de enfermedades.

Existen cuatro reglas que definen el envejecimiento, indicadas por Strehler ya en 1977, se trata de un proceso universal, progresivo, intrínseco, y deletéreo para el individuo aunque no así para las poblaciones.

Una de las características más importantes del envejecimiento es su **heterogeneidad**, ya que hay procesos que mantienen su capacidad funcional hasta los 80-90 años, mientras que otros se alteran en edades mucho más tempranas. Del mismo modo que existe esta heterogeneidad en la tasa de envejecimiento de los diferentes órganos y tejidos de un individuo, existe una heterogeneidad entre individuos de una población de la misma especie con igual edad cronológica, puesto que no todos ellos presentan tampoco idéntica tasa de envejecimiento. Esto ha conducido al concepto de **edad biológica**, que hace referencia a la edad fisiológica, sin que formen parte de ella los procesos patológicos. Para el establecimiento de la edad biológica se hace necesaria la determinación de un número de variables fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, que cambian con la edad y cuyo cambio se relaciona con una muerte prematura (De la Fuente, 2008a). Dicho concepto parece más fiable como índice de salud y rendimiento físico y mental que la edad

cronológica, dada la gran variación interindividual que acompaña al proceso de envejecimiento (Shock, 1979).

La investigación más completa en torno a la edad biológica fue realizada por Forkan y Norris (1980) en un estudio longitudinal sobre más de mil personas. El análisis retrospectivo de dicho estudio mostró que los sujetos que presentaban ciertos parámetros más envejecidos que la mayoría de individuos de su misma edad cronológica, tenían menor esperanza de vida. No obstante, ni en dicho estudio ni en la mayoría de investigaciones acerca de la edad biológica realizadas en el pasado se consideraron parámetros inmunitarios, que en la actualidad se estiman esenciales y altamente representativos de la verdadera edad biológica de un individuo. Así, estudios más recientes han demostrado una correlación positiva entre la longevidad y el mantenimiento de una funcionalidad adecuada de las células T, las NK y las fagocíticas (Ferguson et al., 1995; Ogata et al., 1997; Guayervas et al., 2002a; 2002b; Guayervas y De la Fuente, 2003; De la Fuente, 2002; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente y Miquel, 2009).

1.1.2. El cómo, el dónde y el porqué del envejecimiento. Necesidad de una teoría integradora para explicar el envejecimiento.

Uno de los principales retos para los gerontólogos consiste en ser capaces de discernir entre las causas del envejecimiento y sus efectos, en sistemas tan complejos como los organismos vivos. De hecho, la mayoría de las teorías del envejecimiento indican eventos que son consecuencia del envejecimiento y no su causa. Con cada descubrimiento importante de la biología molecular o celular han aparecido nuevas teorías del envejecimiento o se han modificado las ya existentes. Así, muchas de las teorías actualmente aceptadas, que tratan de explicar el envejecimiento desde distintos puntos de vista, se complementan y completan mutuamente.

Para contestar a las preguntas clave de la gerontología; el cómo, el dónde y el porqué del envejecimiento, se han propuesto más de 300 teorías (Medvedev, 1990), que en su mayoría pueden agruparse bajo dos enunciados: teorías de envejecimiento genéticamente programado y teorías de envejecimiento por acumulación de daño o epigenéticas.

Según las teorías de envejecimiento genéticamente programado, el envejecimiento es el resultado de un programa genético direccionado a ese objetivo. En la actualidad no existen evidencias directas de que existan genes específicos con objeto de envejecer (De la

Fuente, 2008a), a pesar de que existen genes que indirectamente sí que tienen una influencia sobre la longevidad y que han venido a denominarse gerontogenes (Rattan, 1995). Por tanto, el proceso de envejecimiento, que se inicia tras la maduración reproductiva, es el resultado de eventos que no se encuentran genéticamente programados, sino que se producen de manera estocástica o al azar (Hayflick, 2007). Teorías como el límite mitótico de Hayflick (1980) o el acortamiento de los telómeros (Harley et al., 1990) no explican la base del envejecimiento del organismo, y deben ser consideradas como posibles explicaciones a procesos de diferenciación celular o de senescencia replicativa celular.

Una de las teorías que goza actualmente de una mayor aceptación entre los gerontólogos es la **teoría de los radicales libres**, que fue propuesta por Harman ya en 1956 y posteriormente perfilada por otros autores, entre los que destacan científicos españoles (Harman, 1972; Miquel et al., 1980; Miquel y Fleming, 1986; Miquel, 1992; Barja, 2004). El concepto fundamental de esta teoría epigenética es que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daño a biomoléculas producido como consecuencia de las reacciones de oxidación por parte de los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son altamente reactivos e inestables, pero inevitablemente se producen en nuestras células como resultado del necesario consumo de oxígeno (Fig. 1).

Esta teoría se apoya en una multitud de hechos, entre los que destacan: la relación inversa entre la longevidad máxima de las especies y la tasa de metabolismo basal; la acumulación de gránulos de lipofucsina, que es un producto terminal de la peroxidación lipídica, en diversos tejidos; la aparición de enfermedades en la vejez en cuya patofisiología se encuentran implicados los radicales libres, como son el Alzheimer o la aterosclerosis; el efecto beneficioso de la restricción calórica sobre la longevidad; y la relación entre la vida media y el estado de oxidación del individuo (considerando tanto los niveles de oxidantes como los de antioxidantes y enzimas de su metabolismo).

Dado que el oxígeno se emplea principalmente en la respiración que permite el mantenimiento de los procesos metabólicos en los que se basan los sistemas biológicos, la mitocondria, y más específicamente el ADN mitocondrial, son probablemente las primeras dianas de esta oxidación. De esta forma surge la **teoría mitocondrial del envejecimiento** que vendría a completar la teoría de Harman en su forma original. Esta teoría mitocondrial está basada en el daño que los radicales libres llevan a cabo sobre el genoma mitocondrial, dando lugar a que las mitocondrias pierdan su capacidad bioenergética, lo que conduce al

envejecimiento y muerte de las células y, finalmente, del organismo (Miquel et al., 1980; 1984; Miquel y Fleming, 1986; Miquel, 1992).

Como prueba de las alteraciones mitocondriales en el envejecimiento se encuentran diversos cambios observados en ellas con la edad como son: la disminución en el número de mitocondrias; las alteraciones estructurales (vacuolización de la matriz, cambios en las crestas, depósitos de glucógeno, etc.) que se producen en las mismas; la disminución de la actividad de los complejos enzimáticos; la acumulación de compuestos de tipo lipofucsina; el aumento en la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno; y la disminución del contenido en ADN mitocondrial. Como primeramente indicaron Miquel y sus colaboradores (Miquel et al., 1980; Miquel y Fleming, 1986; Miquel, 1992), el proceso de envejecimiento se inicia por tanto en las células postmitóticas, que no pueden regenerar enteramente estas organelas. Por otra parte, la tasa mitocondrial de generación de radicales de oxígeno, el grado de insaturación de sus membranas lipídicas, así como el daño al ADN mitocondrial son menores en las especies más longevas (Pamplona y Barja, 2003).

Las principales clases de macromoléculas biológicas: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono son susceptibles al ataque oxidativo. Aunque la oxidación de todas estas macromoléculas es una de las consecuencias naturales de la vida aeróbica, su modificación oxidativa suele alterar la función que desempeñan en la célula, poniendo en riesgo la homeostasis celular. Así por ejemplo, la peroxidación lipídica modifica las membranas biológicas en las que tiene lugar provocando una alteración de la fluidez, un aumento de la viscosidad, así como descensos en su resistencia eléctrica. También facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas e incrementa los entrecruzamientos con proteínas, lo que disminuye la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Richter, 1987). Además, la peroxidación lipídica conlleva una serie de reacciones paralelas, que determinan la formación de compuestos cíclicos, endoperóxidos, que al descomponerse, forman productos como el malondialdehído (MDA), que es el marcador más ampliamente utilizado, muy reactivos y con capacidad de reaccionar con otras moléculas como proteínas y ADN.

Las células han desarrollado toda una serie de **mecanismos defensivos para protegerse frente a la toxicidad del oxígeno**. En especial, existe toda una variedad de **defensas antioxidantes** que previenen de la formación excesiva de ROS o los neutralizan tras su generación. Sin embargo, estos mecanismos de defensa no son infalibles, de modo que cuando se produce un desequilibrio entre los compuestos oxidantes y las defensas

antioxidantes, causado por un exceso de ROS y/o una menor disponibilidad de los antioxidantes, se da lugar a una situación de estrés oxidativo que resulta en el daño celular (Sies, 1986), y se encuentra en la base del envejecimiento y de las enfermedades asociadas al mismo (Sastre et al., 2000). A pesar de esto, no podemos olvidar que el oxígeno es esencial para la vida, y de hecho, las ROS en concentraciones adecuadas intervienen en una variedad de procesos fisiológicos que son fundamentales para nuestra supervivencia (Knight, 2000; Yoon et al., 2002).

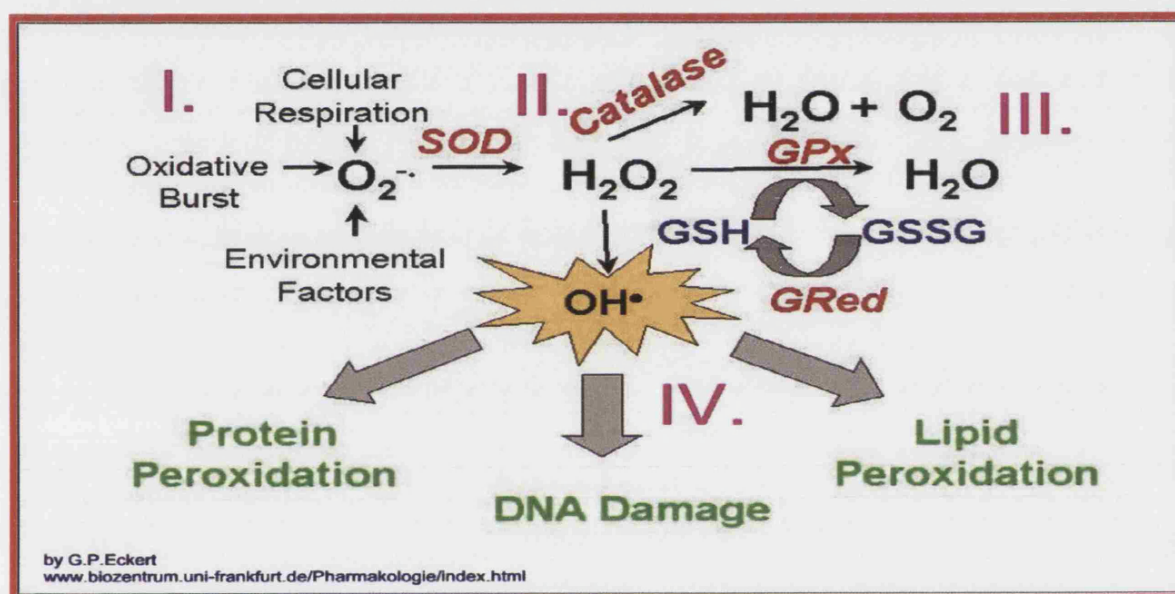


Figura 1. Teoría de la oxidación o de los radicales libres para explicar el proceso de envejecimiento. El envejecimiento es consecuencia de la acumulación de daño oxidativo a biomoléculas causado por la alta reactividad de los radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos en las células, especialmente en las mitocondrias, como resultado del necesario uso del oxígeno. Fuentes exógenas y los leucocitos, principalmente mediante escapes en el transcurso del estallido respiratorio, pueden también conducir al aumento de ROS y RL. El primer RL que aparece en las células es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el RL más reactivo, que lleva a cabo la oxidación de biomoléculas. Las células han desarrollado una amplia variedad de mecanismos antioxidantes para defenderse de la toxicidad del oxígeno. Destacan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), que transforma el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , y catalasa (CAT), que neutraliza éste último y es especialmente relevante para la protección frente al estrés oxidativo severo. El glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante que presenta el organismo para eliminar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). La enzima antioxidante glutatión reductasa (GR) se emplea para devolver al glutatión su poder reductor. No obstante, ciertos niveles de ROS son necesarios para multitud de procesos fisiológicos que son esenciales para la supervivencia, por lo que las funciones del organismo se basan en un equilibrio perfecto entre ROS y protección antioxidante. El proceso de envejecimiento es resultado del desequilibrio entre ambos, que conduce al estrés oxidativo, resultando en el daño celular y el deterioro de las funciones celulares.

También existen **mecanismos de reparación y de recambio** de los componentes dañados, que junto con los mecanismos de eliminación de los compuestos oxidantes

suonen los sistemas clásicos de protección frente al daño en las células. Por ejemplo, las proteínas oxidadas son degradadas por el sistema lisosomal y preferentemente a través del proteasoma 20S (Szweda et al., 2002). El desequilibrio entre éstos y el daño celular da lugar a una acumulación de daño, que tiene como resultado la pérdida funcional y, finalmente, la muerte de las células.

No obstante, estudios recientes apoyan la idea de otra línea de defensa basada en la **susceptibilidad inherente de las macromoléculas al daño oxidativo**. Esta susceptibilidad, definida como la facilidad a sufrir daño oxidativo, está intrínsecamente asociada con la composición química específica de las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. En el contexto del estrés oxidativo, es especialmente relevante enfatizar que: a) los residuos de metionina de las proteínas se encuentran entre los aminoácidos más susceptibles a la oxidación por radicales libres, y también los de cisteína (Stadtman et al., 2005); b) de las 4 bases nucleotídicas, la guanina es la que, generalmente, se oxida con más facilidad (Bjelland y Seeberg, 2003); c) los ácidos grasos altamente insaturados de las membranas celulares son las macromoléculas más susceptibles al daño oxidativo en las células, sensibilidad que aumenta en función del número de dobles enlaces (Hulbert et al., 2007). Finalmente, d) la reactividad de los carbohidratos, centrándonos especialmente en los monosacáridos de interés biológico, depende de su existencia en la estructura abierta (carbonilo) o en anillo (hemiacetal o hemiquetal). La glucosa es el monosacárido más estable y menos reactivo (Bunn y Higgins, 1981).

Con estas premisas, los datos disponibles muestran que en vertebrados homeotermos longevos (mamíferos y aves): a) las proteínas celulares tienen un menor porcentaje de metionina (Portero-Otin et al., 2004; Ruiz et al., 2005); b) la guanina es el nucleótido menos abundante en el ADN mitocondrial (Samuels, 2005); c) los ácidos grasos altamente insaturados (con más de dos dobles enlaces) son menos abundantes en las membranas biológicas (Hulbert et al., 2007; Pamplona y Barja, 2003) y d) la glucosa se revela como el combustible metabólico universal y es el monosacárido más abundante (Bunn y Higgins, 1981).

Como norma, las reacciones químicas en las células vivas se encuentran bajo un estricto control enzimático, de acuerdo con un programa metabólico estrechamente regulado. Un importante factor implícito a la evolución biomolecular es la minimización de reacciones laterales no deseadas. No obstante ocurren reacciones incontroladas y potencialmente deletéreas, incluso bajo condiciones fisiológicas. Así pues, a partir de los

datos disponibles se puede inferir que, a lo largo de la evolución, las especies animales aerobias de larga vida fueron disminuyendo la abundancia relativa de los componentes estructurales más sensibles al daño oxidativo, obteniendo de esta manera una mayor estabilidad estructural y una menor susceptibilidad al estrés oxidativo (Pamplona y Bara, 2007).

Considerando todo lo anteriormente expuesto, estas teorías nos aproximan a entender cómo se produce el proceso de envejecimiento; a través de la oxidación provocada por el estrés oxidativo que se encuentra en la base de multitud de cambios asociados a la edad que afectan a muchos aspectos, incluyendo a aquellos morfológicos, fisiológicos y comportamentales, y a todos los niveles de organización, esto es, molecular, celular, tisular, orgánico y al del organismo en su totalidad. También responden a la pregunta acerca de dónde se inicia el envejecimiento; en las células postmitóticas. Pero, ¿por qué envejecemos?

Para comprender el porqué del envejecimiento, es necesario considerar varias **teorías evolutivas** publicadas largo tiempo atrás. Según éstas, el envejecimiento es consecuencia de caracteres seleccionados en la evolución por ser ventajosos para los jóvenes, lo que permite a éstos llegar a la edad reproductiva en la mejor condición, asegurando así la perpetuación de la especie, sin considerar que sean luego esos mismos caracteres desventajosos para los viejos. Parece evidente que la selección actúa previamente a la edad adulta y el mantenimiento de la especie tiene más sentido biológico que la longevidad del individuo. Lamentablemente, esto conduce a que la longevidad no puede ser seleccionada, ya que la reproducción tiene lugar en la edad joven, de modo que se hace difícil la selección de los genes para aumentar la longevidad entre generaciones (Williams, 1957). De este modo, el envejecimiento del individuo de una determinada especie animal, que es resultado de la pérdida de su capacidad bioenergética y de sus funciones fisiológicas una vez que alcanza su madurez sexual, y que finalmente le conduce a la muerte, es irrelevante desde el punto de vista evolutivo, puesto que los genes de la misma, a pesar de que se encuentren alojados en somas desechables, tienen una capacidad de supervivencia ilimitada gracias a la reproducción sexual (Kirkwood y Holliday, 1979).

Dada la complejidad que caracteriza al proceso de envejecimiento, una teoría basada en un único mecanismo es incapaz de dar una explicación satisfactoria para todos los aspectos que caracterizan al mismo. Esto justifica la propuesta de una **teoría integradora** que incluye conceptos desarrollados en el pasado que han dado lugar a

explicaciones parciales acerca del mecanismo de este proceso y otros más actuales (Miquel, 1991; 1998; Viña et al., 2007; De la Fuente y Miquel, 2009), que en conjunto nos permiten afirmar que el envejecimiento es el resultado de la diferenciación de las células somáticas, especialmente de aquéllas incapaces de dividirse tales como las neuronas. Este proceso se encuentra asociado a un alto consumo de oxígeno por parte de las mitocondrias, que resulta en el daño oxidativo a sus moléculas, en especial al ADN mitocondrial. Por tanto, el consumo de oxígeno, necesario para la producción de energía que potencia las funciones durante la edad reproductiva, es también el principal mecanismo del declive funcional que se produce con posterioridad a ésta. Por último, dado que el envejecimiento es irrelevante desde el punto de vista de la supervivencia de las especies, que se encuentra asegurada a través de la reproducción, no puede ser considerado un efecto programado de los altos niveles de estrés oxidativo.

1.1.3. Papel del sistema inmunitario en el envejecimiento. La teoría de oxidación-inflamación.

Recientemente, las aportaciones de nuestro grupo y de otros autores (De la Fuente et al., 2005; De Martinis et al., 2005; Salvioli et al., 2006; De la Fuente, 2008a) han conducido a la elaboración de una nueva teoría de envejecimiento, que proporciona mayor precisión a los conceptos unificadores mencionados con anterioridad. Esta nueva teoría propone un papel central del sistema inmunológico, no como base del envejecimiento, sino como mecanismo que modifica la tasa a la que éste se produce. Según ésta, la inflamación y el estrés oxidativo crónico en los leucocitos jugarían un papel fundamental en la inmunosenescencia, contribuyendo de forma determinante a la pérdida de la homeostasis corporal y de la salud, a la aceleración del proceso de envejecimiento y a la muerte prematura (De la Fuente, 2008b; De la Fuente y Miquel, 2009). Así, a pesar de que en el pasado únicamente se consideró la participación del sistema inmunitario en el componente inflamatorio del envejecimiento, llevando al grupo de Franceschi a acuñar el término "inflamm-aging" (Salvioli et al., 2006; Franceschi, 2007), éste ha sido más recientemente sustituido por el de "oxi-inflamm-aging", haciendo referencia también al importante papel que juegan los leucocitos en la oxidación que se produce con la edad (De la Fuente y Miquel, 2009).

1.1.3.1 La inmunosenescencia. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica.

El envejecimiento va acompañado de un declive en los sistemas fisiológicos, incluyendo al sistema inmunitario. La inmunosenescencia en sí misma puede ser considerada como la prueba de que los efectos beneficiosos del sistema inmunitario en su fervor por neutralizar a los agentes dañinos en etapas tempranas de la vida, son los mismos que se hacen perjudiciales para el individuo en su vejez, en una etapa no prevista por la evolución (De Martinis et al., 2005).

Ya en el pasado surgieron varias teorías que implicaron al sistema inmunitario en los procesos de envejecimiento (Walford, 1969; Burnet, 1970; Makinodan y Kay, 1980), en base al control que este sistema ejerce sobre las células transformadas y por tanto en el mantenimiento de la integridad del organismo, a su deterioro progresivo que se manifiesta como una menor capacidad de respuesta al avanzar la edad, y al hecho de que este deterioro es primario, como lo sugiere la involución temprana del timo, órgano crucial del sistema inmunitario.

En efecto, con el envejecimiento se pierden y deterioran los tejidos linfoides de timo, bazo, ganglios y médula ósea. El timo tiene un papel central en los cambios del sistema inmunitario con la edad, que ha llevado incluso a denominarle el “reloj biológico” del envejecimiento (Aw et al., 2007; Gruver et al., 2007).

Además, con el paso del tiempo se produce una disminución en la eficacia funcional del sistema inmunológico, así como en su capacidad de respuesta. Como consecuencia, existe en los individuos ancianos, una mayor incidencia de infecciones, enfermedades autoinmunes y cánceres (Ginaldi et al., 1999a; 1999b). De hecho, los procesos infecciosos son una de las principales causas de la elevada tasa de mortalidad en las poblaciones de edad avanzada (High, 2004; Kumar y Burns, 2008). Por tanto, el sistema inmunitario se deteriora con la edad, y este hecho es determinante en la mayor morbilidad y mortalidad asociada al envejecimiento (Wayne et al., 1990). Por el contrario, el mantenimiento de un buen estado funcional del sistema inmunitario es un predictor no sólo de salud sino también de longevidad, como veremos más adelante (Wayne et al., 1990). Por estas razones, se ha propuesto la valoración de dicho estado como un excelente marcador de edad biológica. No obstante, conviene tener en cuenta que la valoración de un único parámetro inmunitario no permite determinar una buena o mala función inmunitaria.

Además, la heterogeneidad en las edades cronológicas de los animales de experimentación utilizados en los diversos estudios, ha dado lugar a una gran disparidad de resultados en cuanto a los cambios de ciertas funciones inmunitarias con la edad. Así, el empleo de animales muy jóvenes como representativos de la edad adulta puede inducir a error cuando son comparados con individuos viejos puesto que en muchos casos se ha observado una similitud en ciertos parámetros inmunitarios entre los animales muy jóvenes y los viejos, siendo dichos parámetros significativamente diferentes a los observados en los animales adultos (Medina et al., 1998; De la Fuente, 2007). Del mismo modo, a lo largo del envejecimiento se podrían producir procesos multifásicos en un intento del organismo por recuperar la homeostasis, que podrían llevar a la conclusión equivocada de que dichas funciones no se deterioran al envejecer. Por otra parte, la existencia de efectos tanto circadianos como circanuales sobre el sistema inmunitario hace importante la consideración tanto de la hora del día como de la estación del año en que se han realizado los estudios (Hiemke et al., 1995; Haus y Smolensky, 1999). Además, dada la compleja red de interacciones que se establece entre las células inmunitarias, la presencia de unas u otras en una determinada localización así como el estímulo empleado para desencadenar la respuesta inmunitaria, pueden ser determinantes a la hora de estudiar los cambios asociados a la edad en dicha respuesta (De la Fuente, 2003; 2007).

A pesar de todas estas cuestiones y de existir cierta controversia al respecto, en la actualidad se acepta que prácticamente todos los componentes del sistema inmunológico así como sus interacciones sufren una profunda reestructuración con el envejecimiento, que conduce a cambios que incluyen parámetros disminuidos y también aumentados (Ortega et al., 2000a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008a; 2008b; Kumar y Burns, 2008). De este modo, una inflamación crónica en bajo grado (De Marinis et al., 2005; Salvioli et al., 2006), y sin embargo un desvío hacia una respuesta Th2 antiinflamatoria cuando la inflamación es realmente necesaria para combatir una infección (Ginaldi et al., 1991a; Lord et al., 2001), parecen ser hechos bien establecidos que se producen en la inmunosenescencia. La respuesta inmunitaria se encuentra medada principalmente por moléculas como las citoquinas, que comunican a las células inmunológicas entre sí. Algunas de las más importantes y sus efectos moduladores más destacados se muestran en la tabla 1.

Una de las manifestaciones más claras y mejor estudiadas de la **inmunosenescencia** se refiere a los cambios que acontecen en la composición de las

Tabla 1. Algunas de las principales citocinas, quimioquinas y factores de crecimiento, su origen, dianas y efectos más relevantes dentro del sistema inmunitario.

MOLECULE	ORIGINE	TARGETS AND MAIN EFFECTS
IL-1 α / IL-1 β	Monocyte-macrophages, in response to inflammation, injury, infection (Dinarello, 1997)	Activate lymphocytes, proinflammatory, fever, induce acute phase response genes (Dinarello, 1997)
IL-2	Activated T cells (He and Malek, 1998)	Autocrine or paracrine T cell growth factor (He and Malek, 1998), induces regulatory T cells and/or eliminates abnormally activated T cells by apoptosis induction (Suzuki et al., 1999), effects on many cells such as B cells, NK cells, macrophages, neutrophils (Smith, 1980; 1988; He and Malek, 1998)
IL-3	Activated T cells (Otsuka et al., 1988)	Activates multipotential hematopoietic cells (stem cells) and developmentally committed cells such as granulocytes, macrophages, mast cells, erythroid cells, eosinophils, basophils and megakaryocytes (Dorssers et al., 1987)
IL-4	Activated T cells, mast cells, basophils and NKT cells (He and Malek, 1998; Paul, 1991)	Many cell types, including B cells, T cells, macrophages, hematopoietic and nonhematopoietic cells, required by B cells to switch to the production of IgE (mediates immediate hypersensitivity reactions, help defend against helminth infections) (Paul, 1991), inhibits macrophage activation and most of the effects of IFN- γ on them (Cameron and Kelvin, 2003), growth and differentiation of Th2 cells (support humoral immunity, downregulate inflammatory actions of Th1 cells) (Kopf et al., 1993), production early after antigen exposure favour the development of Th2 cells (Paul and Seder, 1994)
IL-5	Activated T cells (especially Th2 cells) (Azuma et al., 1986)	Growth and differentiation of eosinophils and late-developing B cells (Kinoshita et al., 1986; Campbell et al., 1987)
IL-6	Fibroblasts, endothelial cells, macrophages, T cells (Th1) and B cells (Cameron and Kelvin, 2003)	Primary inducer of fever, hormones, acute phase proteins and T and B cell expansion upon injury and infection (Schgal et al., 1987), cofactor in hematopoiesis by increasing GM-CSF and M-CSF expression (Kopf et al., 1998)
IL-9	Mainly expressed by activated T cells, especially Th2 cells (Renauld et al., 1990)	Promotes growth of mast cells, B cells and other T cells (Mosmann and Sad, 1996; He and Malek, 1998; Townsend et al., 2000)
IL-10	Mainly monocytes and T cells (Th2), also other cell types including B cells, mast cells and keratinocytes (Moore et al., 1993)	Major role in suppressing inflammatory responses by inhibiting the synthesis of IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α and GM-CSF by cells such as macrophages and Th1 cells (Vieira et al., 1991; Moore et al., 1993), stimulator of thymocytes, mast cells and B cells (Moore et al., 1993)
IL-12 (p40) (Soluble receptor) / IL-12 (p70) (Active heterodimer)	APCs (Cameron and Kelvin, 2003)	Immunoregulation of NK cells and T cells (Gately et al., 1998), key role in cell-mediated immunity by pushing the balance Th1/Th2 cells towards Th1-type (Magrath et al., 1996)
IL-13	Activated T cells (Cameron and Kelvin, 2003)	Induces IgE production by B cells and inhibits inflammatory cytokine production (Minty et al., 1993), development and maintenance of Th2 cells (McKenzie et al., 1998)
IL-17	T cells (CD4 memory cells) (Janeway et al., 2001a)	Induces cytokine production by epithelia, endothelia, and fibroblasts (Janeway et al., 2001a)
GM-CSF	Many cell types, including macrophages and T cells (Lee et al., 1985)	Stimulates a variety of precursor cells, macrophages, neutrophils, eosinophils (Kauschansky et al., 1986)
IFN- γ	Activated T cells (Th1) and NK cells (Boehm et al., 1997)	Antiviral, stimulates macrophages, increases antigen processing and expression of MHC molecules, promotes an Ig class switch to IgG2a antibody secretion, controls the proliferation of transformed cells (Boehm et al., 1997), hallmark of proinflammatory Th1 cells (Dalton et al., 1993), may act in synergy with IL-12 to accelerate development of the Th1 cell subset and repress Th2 cells (Boehm et al., 1997)
KC	LPS-stimulated macrophages (Ohmori and Hamilton, 1994), keratinocytes (Ley, 2003)	Neutrophil-selective chemokine (Kobayashi, 2006), activates macrophages (Ohmori and Hamilton, 1994)
MCP-1	Activated macrophages, monocytes, fibroblasts, keratinocytes (Janeway et al., 2001b)	Chemokine for monocytes, T cells, dendritic cells, eosinophils, basophils and NK cells, linkage to Th2 type cells (Janeway et al., 2001b; Cameron and Kelvin, 2003), activates macrophages, basophil histamine release, acts on monocytes, inducing their migration from the bloodstream to become tissue macrophages (Janeway et al., 2001b)
MIP-1 β	Activated macrophages, monocytes, neutrophils, endothelium (Janeway et al., 2001b)	Chemokine for monocytes, T cells, dendritic cells, eosinophils and NK cells (Janeway et al., 2001b; Cameron and Kelvin, 2003), competes with HIV-1 (Janeway et al., 2001b)
RANTES	T cells, endothelium, platelets (Janeway et al., 2001b)	Chemokine for monocytes, T cells, dendritic cells, eosinophils, basophils and NK cells (Janeway et al., 2001b; Cameron and Kelvin, 2003), degranulates basophils, infiltration into tissues of a range of leukocytes including effector T cells, activates T cells, chronic inflammation (Janeway et al., 2001b)
TNF- α	Mainly by activated macrophages, NK cells and T cells (mainly Th1 cells) (Gruss and Dower, 1995)	Receptor CD120a, b expressed on virtually all cell types except erythrocytes (Cameron and Kelvin, 2003), tumour cell killer (Pennica et al., 1984), endothelial activation, leucocyte movement, crucial mediator in acute and chronic inflammatory conditions (Gruss and Dower, 1995; Sedgwick et al., 2000), direct pyrogen and indirectly alters hormone and IL-1 secretion to induce fever, induces apoptosis in some targets (Ashkenazi y Dixit, 1998)
VEGF	Macrophages (Ramos et al., 1998), monocytes (Yang et al., 2003), hematopoietic stem cells (Bautz et al., 2000)	Enhances monocyte activation, inhibits NF- κ B activation in hematopoietic progenitor cells (Dikov et al., 2001) affecting development of B cells, T cells and dendritic cells (Burkly et al., 1995; Caamaño et al., 1998), anti-apoptotic factor (Dias et al., 2002), inhibits maturation of antigen-presenting cells, dendritic cells and many other hematopoietic cells (Gabrilovich et al., 1998)

poblaciones leucocitarias con la edad, así como en la expresión de sus marcadores de superficie. Entre los cambios más evidentes en este sentido está el que se produce en las **células T**. En general, podemos decir que el número de linfocitos T CD3+ disminuye con la edad de forma significativa, probablemente como consecuencia del proceso de involución tímica (Pawelec et al., 2002). Sin embargo, se ha observado que no todas las **subpoblaciones** de células T se comportan igual. Así, se ha comprobado que los linfocitos CD4+ de sangre periférica disminuyen con el paso del tiempo de forma más acusada que los CD8+. Además, en ambas subpoblaciones, las células vírgenes son las que principalmente van desapareciendo al envejecer (Chen et al., 2002). En este sentido, otros autores han indicado una expansión clonal con el envejecimiento de estos tipos celulares, principalmente de los linfocitos CD8+, pero también de los CD4+ (Maini et al., 1999), siendo la mayoría de ellos negativos para el marcador CD28 (Boucher et al., 1998). La pérdida de este marcador coestimulador, supone que la mayoría de estos linfocitos están en un estado de reposo, en el caso de los CD8+ (Franceschi et al., 1999), o son incapaces, en el caso de los CD4+, de promover la diferenciación y la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Estas células CD4+CD28- son además potentes secretoras de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ (Weyand et al., 1998). Por otro lado, se ha comprobado también que los linfocitos T $\gamma\delta$ disminuyen con el envejecimiento, si bien sufren un aumento de la expresión del marcador de activación CD69 (Colonna-Romano et al., 2002). Recientemente, se ha mostrado que las células T reguladoras, de carácter supresor, aumentan en número con la edad, mientras que parecen mantener su capacidad funcional, lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor actividad supresora en los individuos ancianos (Gregg et al., 2005; Trzonkowski et al., 2006).

Todos estos cambios cuantitativos han sido correlacionados con la longevidad de los individuos y con el riesgo de mortalidad y morbilidad. Así, Luciani et al. (2001), consideran el descenso de las células T vírgenes y el aumento de las de memoria como un parámetro predictor de mortalidad, mientras que otros autores han definido el fenotipo inmunitario de riesgo en función del aumento de los linfocitos CD8+, la disminución de los CD4+ y CD19+, junto con una pobre respuesta linfoproliferativa, puesto que se encuentran asociados con una mayor probabilidad de muerte (Wikby et al., 1998; De Martinis et al., 2006).

Además, de entre todas las células que componen el sistema inmunitario (Fig. 2), los linfocitos T han sido los más estudiados y se considera que su **funcionalidad**, en

especial la de los linfocitos T helper, es la más afectada por el proceso de envejecimiento (Miller, 1996; Castle, 2000; Pawelec et al., 2002; Aw et al., 2007; Gruver et al., 2007). Una de las funciones más importantes de los linfocitos T es la **proliferación** en respuesta a un antígeno específico o expansión clonal. Se ha comprobado que la capacidad proliferativa en respuesta a mitógenos está significativamente reducida con la edad tanto en humanos como en ratones, y también en modelos de envejecimiento prematuro en ratón (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008a; 2008b).

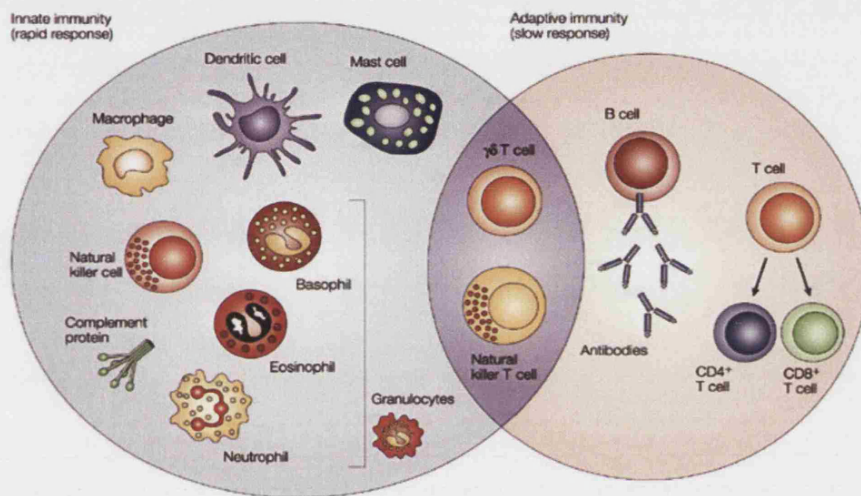


Figura 2. Algunos de los principales componentes celulares de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Las células NKT y T $\gamma\delta$ son linfocitos citotóxicos que se encuentran en la interfase entre ambos tipos de inmunidad.

En relación con la **producción de citoquinas**, una de las más estudiadas por su importancia en los procesos de linfoproliferación es la interleuquina 2 (IL-2) (Pahlavani y Richardson, 1996). La mayoría de los autores coinciden en señalar que esta citoquina disminuye con la edad en humanos y roedores, al igual que en modelos murinos de envejecimiento prematuro, (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008a; 2008b), aunque otros han observado un aumento en la producción de esta citoquina en animales viejos por parte de las células CD4+CD28-, en condiciones basales (Weyand et al., 1998). En cuanto al resto de citoquinas, los resultados son más controvertidos, observándose en la vejez aumentos, disminuciones o niveles similares a los de adultos. Así, en el caso del IFN- γ , se han descrito tanto mayores niveles de esta citoquina con la edad (Hobbs y Ernst, 1997; Weyand et al., 1998; Globerson y Effros, 2000) como disminuciones de la misma (Candore et al., 1993; Cakman et al., 1996). Otras citoquinas como la IL-4, IL-

5, IL-10 e IL-8 parecen aumentar al envejecer (Cakman et al., 1996; Hobbs y Ernst, 1997; Mariani et al., 2001), aunque también se han descrito descensos o ninguna modificación en sus niveles (Candore et al., 1993; Kirman et al., 1996). Estos resultados contradictorios pueden deberse, como se indicó anteriormente, a diferencias en la edad cronológica de los animales estudiados, en la localización de la que se han obtenido los linfocitos, o en las condiciones experimentales y de cultivo de los mismos. Así, por ejemplo, Colonna-Romano et al. (2002), observaron que la producción basal de TNF- α por parte de linfocitos T $\gamma\delta$ de individuos viejos es mayor que la de los adultos pero su capacidad de producirlo en respuesta a un estímulo está disminuida.

Como paso previo a la linfoproliferación, los linfocitos deben migrar hacia el foco de infección. Este tráfico linfocitario está mediado por las interacciones secuenciales entre distintas moléculas de adhesión de los linfocitos y el endotelio, que permiten a los linfocitos abandonar el torrente sanguíneo para infiltrar los tejidos dañados. En este contexto son también de gran importancia las quimioquinas, que regulan todos estos procesos de **adhesión y tráfico** leucocitario. Entre las moléculas de adhesión, se ha observado que, en general, aumentan con la edad. Concretamente, De Martinis et al. (2000), han comprobado que los linfocitos T de individuos viejos sobre-expresan las moléculas de adhesión CD49d, CD50 y CD62L, si bien, el número de células que lo hacen es menor que en los individuos adultos. Consecuentemente, la adherencia de los linfocitos de sangre periférica en humano y de los procedentes de peritoneo de ratón es mayor en individuos de edades avanzadas que en adultos, y en ratones que presentan un envejecimiento prematuro con respecto a sus controles de edad (De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008). En cuanto a las quimioquinas, algunas de las más implicadas en el tráfico de linfocitos son la IL-8, RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (Middleton et al., 1997), siendo las tres últimas especialmente importantes en la redistribución de los linfocitos T memoria hacia órganos linfoides como los ganglios (Tedla et al., 1998). En estudios recientes se ha comprobado que los linfocitos T de individuos viejos producen mayores cantidades de MIP-1 α , IL-8 y RANTES tras ser estimulados con anti-CD3 que los de jóvenes, pero, sin embargo, la expresión de los receptores (CCR1, CCR3 y CCR5) para estas citoquinas está disminuida (Mariani et al., 2001, 2002). Por otra parte, en trabajos previos de nuestro grupo hemos podido comprobar que los linfocitos de ratones viejos procedentes de órganos inmunocompetentes, presentan una mayor capacidad migratoria que los de los animales adultos (Medina et al., 1998b), mientras que la quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratón o de sangre periférica en

humanos de edades avanzadas se encuentran disminuidas (De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008). También, la quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos se encuentra disminuida con respecto a sus controles de edad (Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b).

Además de las funciones comentadas hasta ahora, otros procesos de las células T se deterioran con el paso del tiempo. Uno de ellos, fundamental para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario es la muerte celular programada o **apoptosis**. Mediante él se lleva a cabo la eliminación de las células senescentes o defectuosas, evitando que se liberen al medio externo sustancias intracelulares que podrían dañar a las células vecinas provocando reacciones inflamatorias. En diversos estudios se ha observado que la expresión de CD95 en leucocitos aumenta con la edad (Aggarwal y Gupta, 1998; Pawelec et al., 1999; Schindowski et al., 2000), lo que se ha correlacionado con una susceptibilidad de sufrir apoptosis, que parece ser mayor con el envejecimiento. Esta mayor susceptibilidad a sufrir apoptosis se ha asociado también con el estrés oxidativo intracelular, que se encuentra aumentado en la vejez con respecto a los valores de adultos (Schindowski et al., 2000). Sin embargo, otros autores consideran que CD95 no es un buen marcador de susceptibilidad frente a la apoptosis ya que en células CD8⁺ resistentes a la apoptosis, su expresión está aumentada (Effros y Pawelec, 1997; Spaulding et al., 1999). Así, parece ser que otros mediadores en los procesos apoptóticos, las caspasas, correlacionan mejor con la sensibilidad a dichos procesos. Se ha observado que las actividades caspasa 3 y 8, tanto constitutivas como inducidas por CD95, están aumentadas en células de individuos viejos y disminuidas en los linfocitos T CD8⁺ resistentes a apoptosis (Aggarwal y Gupta, 1999; Spaulding et al., 1999). Otro de los factores que influye en la apoptosis es el perfil de producción de citoquinas de la célula T, aunque no existen conclusiones claras al respecto. Parece que el perfil Th2 confiere cierta resistencia frente a la apoptosis inducida por CD95, aunque esto no se ha observado en otras formas de muerte celular programada (Varadhachary et al., 1997; Zhang et al., 1997). Además, las células T CD8⁺ con susceptibilidad disminuida a la apoptosis presentan un perfil tipo Th1 (Solana y Pawelec, 1998).

En cuanto a los **linfocitos B**, parece ser que sufren un descenso pronunciado en sangre periférica con la edad, aunque los niveles de inmunoglobulinas circulantes aumentan con el envejecimiento (Paganelli et al., 1992). Algunos autores postularon en el pasado que los defectos funcionales de los linfocitos B que se observan con la edad, se deben más a las

alteraciones en las células T que cooperan con ellos que a ese descenso en su número (Weksler, 2000). No obstante, estudios recientes indican que parece existir también un deterioro intrínseco con la edad en los linfocitos B (Colonna-Romano et al., 2008). La manifestación más clara de las alteraciones que se producen en la **inmunidad humoral** en ancianos es la deficiente generación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación (Ben-Yehuda y Weksler, 1992). También se ha observado que la respuesta antigénica frente a antígenos extraños está reducida en los individuos viejos pero, sin embargo, la proporción de células secretoras de anticuerpos es mayor que en los individuos más jóvenes (Weksler, 2000).

Aunque la médula ósea no sufre un proceso de involución como el timo, se ha observado una disminución con la edad en el **número** de células B y de todos sus precursores en esta localización inmunológica (Szabo et al., 1999; Weksler y Szabo, 2000), lo que podría explicar el menor número de células B observado en la sangre periférica de individuos viejos (Huppert et al., 1998). De forma similar a lo que sucede con los linfocitos T, algunos autores, como Colonna-Romano et al. (2003), han descrito un aumento de los linfocitos B memoria (CD27+) y un descenso de los vírgenes (CD27-) en sangre periférica de ancianos. CD27 es un marcador implicado en los procesos de diferenciación de la célula B hacia célula plasmática. Así, al tener menos células B vírgenes, la respuesta de los individuos viejos frente a nuevos antígenos estará disminuida. Otras moléculas de superficie básicas para la función de las células B y que se alteran con la edad son CD5 y CD40. CD5 está asociada con la producción de anticuerpos independiente de células T y parece ser relevante en la producción de los mismos inducida por células NK (Blanca et al., 2001). En cuanto a CD40, su unión con el ligando CD40L (CD154), es necesario para la respuesta de anticuerpos dependiente de células T. Tanto las células B CD5+ como las CD40+ sufren una disminución en cuanto a su número absoluto con el envejecimiento, pero en lo que se refiere al porcentaje, solo disminuyen los CD5+, permaneciendo igual los CD40+ (Colonna-Romano et al., 2003). Otros autores, por el contrario, han descrito un aumento en la proporción de linfocitos B CD5+ en sangre periférica de individuos viejos (Weksler et al., 1996; Weksler, 2000). En este sentido, se ha observado también un aumento en las inmunoglobulinas en sangre periférica con el envejecimiento, siendo éstas en su mayoría autoanticuerpos. Se cree que las principales células productoras de estos autoanticuerpos son los linfocitos B CD5+ (Weksler et al., 1996; Weksler, 2000). Por otro lado, como ya indicaron Ligthart et al. (1990), una gran proporción de estos anticuerpos

que aumentan con la edad son inmunoglobulinas monoclonales, puesto que los fallos en el reordenamiento génico no afectan solo al BCR sino también a la diversidad del repertorio de inmunoglobulinas y a la capacidad para generar anticuerpos de alta afinidad (Le Maoult et al., 1997; Weksler, 2000).

La **capacidad proliferativa** de los linfocitos B, como sucede con los T, está reducida. Se ha comprobado que la respuesta proliferativa frente a lipopolisacárido bacteriano (LPS), anti-IgM o anti-CD40 de células B esplénicas de ratones viejos, es significativamente menor que la de los animales jóvenes (Frasca et al., 2003).

Además de estar en menor número, las células pre-B de animales viejos presentan una capacidad disminuida para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad de sufrir **apoptosis** (Szabo et al., 1999; Weksler y Szabo, 2000).

A pesar de que las alteraciones asociadas a la edad en las células de la **inmunidad innata** han sido menos estudiadas que las que se producen en linfocitos, las evidencias científicas acumuladas durante la última década demuestran también un fuerte impacto del envejecimiento sobre este tipo de inmunidad. Los cambios asociados a la edad en las **células “natural killer” (NK)** han sido los más extensamente estudiados dentro de la inmunidad innata, y se considera que sus alteraciones funcionales pueden contribuir de manera determinante a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y, especialmente, neoplásicas en el envejecimiento. Estas células representan una población de linfocitos granulares grandes cuyo fenotipo en humanos, viene definido por la expresión de CD16 (un receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas de tipo IgG) y CD56 (una isoforma de la molécula de adhesión neural N-CAM), así como por la ausencia del complejo CD3. Otros marcadores característicos de estas células son CD57 y CD94 (glicoproteínas tipo lectina C). Numerosos autores han señalado un aumento en el **porcentaje** de células NK con la edad en sangre periférica (Borrego et al., 1999; Solana et al., 1999; Solana y Mariani, 2000; Ginaldi et al., 2001). Además, dentro de esta población podemos distinguir dos grupos en función del grado de expresión de CD56. Así, las células con baja expresión del marcador (CD56^{dim}), que comprenden el 90-95% del total de células NK, son altamente citotóxicas y representan a la población de células maduras. Por el contrario, aquellas células NK con alta expresión de CD56 (CD56^{bright}) son poco citotóxicas, proliferan marcadamente tras la unión de la IL-2 a su receptor de membrana, del que forma parte el antígeno de diferenciación leucocitaria CD25, y se consideran células inmaduras. Pues bien, se ha comprobado que el aumento que experimentan las células NK

con la edad se debe, principalmente, a las células CD56^{dim}, es decir, a células fenotípica y fisiológicamente maduras (Krishnaraj y Svanborg, 1992; Borrego et al., 1999). Además, la expresión de otros marcadores como CD57 también parece aumentar con la edad (Borrego et al., 1999) mientras que la de los receptores inhibitorios (p58) no se modifica (Mariani et al., 1994).

Este aumento de las células NK en sangre periférica con el envejecimiento, se correlaciona con la disminución en el porcentaje de células CD3+ y con un aumento en la proporción de las mismas que co-expresan marcadores de células NK, principalmente CD57; las NK-T (Borrego et al., 1999; Tarazona et al., 2002). Se ha visto recientemente que no todas estas células NK-T expresan los mismos marcadores y tampoco su función sería la misma. Las células NK-CD4+ disminuyen en sangre periférica al envejecer mientras que las NK-CD8+ aumentan (De la Rosa et al., 2002; Tarazona et al., 2002).

A pesar de que los cambios en las subpoblaciones de células inmunitarias con la edad pueden explicar algunas de las modificaciones que se producen en la respuesta inmunológica con el envejecimiento, como es el caso del aumento de la relación de linfocitos T memoria y vírgenes (Pawelec et al., 2002; Alberti et al., 2006), las variaciones cuantitativas con la edad en un tipo concreto de célula inmunitaria no tienen que estar asociadas necesariamente a cambios funcionales en el mismo sentido. Un buen ejemplo de esto lo suponen las células NK, que a pesar de aumentar en número sufren un claro declive en su **capacidad citotóxica tumoral** y en la **producción de citoquinas** (Ferrández et al., 1999; Pawelec et al., 2002; Solana et al., 2006; De la Fuente et al., 2008); hechos que se ven reflejados en modelos murinos de envejecimiento prematuro (Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b). Las células NKT también se ven afectadas con la edad en su funcionalidad (Gomez et al., 2008). Sin embargo, las causas de esta menor actividad de las células NK son aún poco conocidas ya que ni la unión célula efectora-célula diana ni el contenido, distribución y utilización de las perforinas parecen ser diferentes en función de la edad (Mariani et al., 1996).

Además, las células NK dependen en gran medida para sus funciones de varias citoquinas, entre las que destaca la IL-2. En respuesta a ella, las células NK son capaces de aumentar su actividad citotóxica, proliferar, y producir y liberar diversas citoquinas, como el IFN- γ o el TNF- α , y quimioquinas como la IL-8, RANTES o MIP-1 α . La disminución en los niveles de IL-2 con el envejecimiento comentada con anterioridad, podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de valorar las alteraciones que sufren las células NK con

el paso del tiempo. Así, numerosos autores han estudiado los cambios en la respuesta de las células NK tras ser estimuladas con IL-2 (Miller, 1991). En relación con la actividad citotóxica, se ha podido comprobar que tanto la IL-2 como el IFN- α y γ , son capaces de inducir actividad citotóxica frente a células K562 en animales viejos (Krishnaraj, 1992, 1997), pero este efecto desaparece cuando la célula diana pertenece a una línea celular más resistente (por ejemplo, Daudi) (Kutza y Murasko, 1994). También se ha observado una menor capacidad proliferativa en respuesta a IL-2 de las células NK de individuos viejos (Borrego et al., 1999) y alteraciones en el perfil de citoquinas secretadas. Así, aunque la producción de TNF- α y la síntesis de perforina por parte de las células NK se mantiene con el envejecimiento (Mariani et al., 1996; Borrego et al., 1999), la producción de IFN- γ está disminuida en los individuos viejos (Krishnaraj y Bloom, 1996). Con respecto a las quimioquinas, se ha comprobado que la producción espontánea de IL-8, RANTES y MIP-1 α no se modifica con la edad, mientras que, en respuesta a la estimulación con IL-2, los niveles de todas ellas son menores en las células procedentes de sujetos viejos (Mariani et al., 2001, 2002).

En relación con las **células fagocíticas y presentadoras de antígeno**, los trabajos son menos numerosos. Las principales células fagocíticas son los macrófagos tisulares, y los monocitos y neutrófilos polimorfonucleares circulantes en la sangre. Estos tipos celulares llevan a cabo una función de defensa no específica, que comienza con la adherencia a tejido endotelial o de otra clase, para moverse hacia el foco infeccioso, y finaliza con la destrucción del patógeno; llevando a cabo por tanto una serie de funciones secuenciales: adherencia, quimiotaxis, ingestión y digestión del material fagocitado, que constituyen lo que se conoce como proceso fagocítico. Tras el procesamiento del material extraño, los fagocitos pueden presentar los determinantes antigénicos a los linfocitos, y además producir una gran cantidad de factores y citoquinas que regulan la respuesta inmunitaria, jugando así un papel importante tanto en su iniciación como en su eficacia.

Algunos autores han observado que el **número** de monocitos de sangre periférica se mantiene con el paso del tiempo (Fagiolo et al., 1993; Cakman et al., 1996), acompañándose esto de un aumento en su actividad. También, en monocitos de sangre periférica, se han observado variaciones con la edad en la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo II, encontrándose una mayor expresión de HLA-DQ pero menor de HLA-DR en ancianos que en adultos (Solana et al., 1991). En un estudio realizado con macrófagos derivados de médula ósea, Herrero et al. (2002) observaron que no había

diferencias entre animales adultos y viejos en cuanto al número de macrófagos ni a sus marcadores de superficie. Sin embargo, tras estimular dichos macrófagos con interferón (IFN- γ), la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo II y tipo IA fue significativamente menor en las células de animales viejos. Por otro lado, Donnini et al. (2002) observaron que la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y II, así como de los marcadores CD80 y CD86, no se modifica con la edad en las células presentadoras de antígeno de ratones BALB/c obtenidas del exudado peritoneal. Además, la proporción de células Mac-3+ (macrófagos) y CD11c+ (células dendríticas), tras cultivar las células peritoneales con GM-CSF e IFN- γ durante 7 días, fue la misma en los animales viejos y en los adultos (Donnini et al., 2002). En cuanto a los neutrófilos de sangre periférica, varios autores han comprobado que la expresión de ciertas moléculas de adhesión se modifica con el envejecimiento. Concretamente, en el caso de CD11b y CD15, se ha indicado un ligero aumento de su expresión en individuos viejos (Esparza et al., 1996), aunque Butcher et al. (2001) no observaron ningún cambio en dichas moléculas. Estos mismos autores han encontrado también niveles similares de CD11a entre adultos y viejos, y una reducción en estos últimos en la expresión de CD16 en los neutrófilos (Butcher et al., 2001).

No obstante, a pesar de que en el pasado se creía que los fagocitos jugaban un papel poco crucial en la disfunción inmunológica que se produce en la vejez, investigaciones más recientes apuntan al declive general en las **actividades funcionales** de estas células como una razón fundamental que explica la susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones bacterianas y víricas en los individuos viejos, siendo éstas las causas más comunes de enfermedad y muerte en ancianos (Ginaldi et al., 1999a; Lord et al., 2001; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2004a; 2005; 2008).

En general, se ha observado en **células polimorfonucleares** de sangre periférica, una mayor adherencia, menor quimiotaxis y capacidad fagocítica, y alteraciones en la capacidad microbicida con la edad (Mohacsí et al., 1992; Malaguarda et al., 2001). Se ha comprobado que la **capacidad de adhesión** a fibronectina y laminina de estas células es ligeramente mayor en los individuos viejos, si bien, tras estimular los neutrófilos con PMA (forbol miristato acetato), fMLP (péptido formilado), GM-CSF o TNF- α , estas diferencias desaparecen (Tortorella et al., 2000). Nuestro grupo también ha podido comprobar una mayor adherencia de los neutrófilos de sangre periférica en individuos de edades avanzadas (Alonso-Fernández et al., 2008; De la Fuente et al., 2008). Además, en el envejecimiento se

ha descrito una menor capacidad migratoria o **quimiotaxis** (Izgüt-Uysal et al., 2003; Alonso-Fernández et al., 2008; De la Fuente et al., 2008) y **fagocitosis** de los neutrófilos (Wenish et al., 2000; Butcher et al., 2001; Izgüt-Uysal et al., 2003; Alonso-Fernández et al., 2008; De la Fuente et al., 2008). Algunos autores han indicado que el reclutamiento de los neutrófilos hacia el foco infeccioso está preservado en la vejez (Esparza et al., 1996; Lord et al., 2001) o incluso aumentado (Wenish et al., 2000), pero una vez en el dicho foco, el principal fallo de los neutrófilos sería su reducida capacidad fagocítica (Lord et al., 2001). En cuanto a la **función microbicida**, se ha observado que la degranulación de enzimas líticas en respuesta a fMLP está reducida en sujetos viejos (Lord et al., 2001), mientras que en la producción de radicales libres como el anión superóxido parece haber resultados contradictorios, debidos, en parte, a las diferentes condiciones de estimulación de los neutrófilos. Así, algunos autores han observado que tras la estimulación con fMLP, los niveles de este anión en células de individuos viejos se mantienen o aumentan ligeramente (Esparza et al., 1996; Lord et al., 2001) mientras que otros han descrito una disminución de los mismos (Tortorella et al., 2000; Izgüt-Uysal et al., 2003). De forma similar, tras la estimulación con PMA o partículas de látex se han descrito aumentos en la producción de superóxido por parte de los neutrófilos de individuos viejos (Izgüt-Uysal et al., 2003; Alonso-Fernández et al., 2008), así como niveles similares a los de adultos en respuesta al primero (Tortorella et al., 2000). Se ha indicado también una mayor **producción de TNF- α** por parte de los neutrófilos con la edad, que podría estar relacionada con el mayor grado de **apoptosis** que sufren estas células con la vejez (Lord et al., 2001). Sin embargo, otros autores han señalado que, en el caso de la apoptosis espontánea, ésta es similar en los neutrófilos de individuos adultos y viejos (Tortorella et al., 1999).

En cuanto a los **monocitos y macrófagos**, los resultados son también heterogéneos, dependiendo, entre otras cosas, de la localización de la que se haya obtenido. Se ha comprobado que los monocitos de individuos adultos y viejos producen la mismas cantidades de RANTES y MIP-1 α en ausencia de estimulación, pero tras estimular las células con LPS, los niveles de estas quimioquinas son mayores en los viejos (Mariani et al., 2002). Otros autores, sin embargo, observaron una menor producción de G-CSF, GM-CSF, IL-8, TNF- β , MIP-1 α e IL-1 β en monocitos de individuos viejos estimulados con LPS (Gon et al., 1996; Sadeghi et al., 1999). En el caso de los macrófagos, parece ser que la producción de IL-1 aumenta con la edad (De la Fuente et al., 2001). En cuanto al TNF- α se han descrito tanto aumento (Pedersen et al., 2000; Tang et al., 2000) como disminución

en sus niveles al envejecer (Corsini et al., 1999), con dependencia del estímulo empleado. Concretamente en los macrófagos alveolares, Zissel et al. (1999) señalaron que la liberación espontánea de TNF- α , TGF- β e IL-6 es similar entre adultos y viejos. No obstante, en estos macrófagos la producción de óxido nítrico (NO) se reduce con la edad (Koike et al., 1999). Mancuso et al. (2001) comprobaron que la producción de metabolitos derivados del ácido araquidónico, como el leucotrieno B4 (LTB4) o la PGE2, no cambia con la edad, pero sí la capacidad fagocítica de estas células frente a *K. pneumoniae*, que resultó ser mayor que en los animales adultos. En relación a los macrófagos peritoneales, se han observado cambios en la mayoría de sus funciones. Así, se ha descrito una disminución de la quimiotaxis y la fagocitosis con la edad, y también en modelos murinos de envejecimiento prematuro, en los que el deterioro de la funcionalidad de estas células se ha relacionado específicamente con la muerte temprana de los individuos (Guayerbas et al., 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente, 2008a; 2008b). Además, Ortega et al. (2000a; 2000b) no observaron cambios en la adherencia de los macrófagos con la edad pero sí indicaron un aumento de la producción de anión superóxido, mientras que otros trabajos señalan una mayor capacidad de adherencia y una menor producción de dicho anión en los macrófagos peritoneales de animales viejos (De la Fuente et al., 2000; 2001) o prematuramente envejecidos (Alvarado et al., 2006a; Álvarez et al., 2006).

Es más, **los sistemas inmunitarios innato y adaptativo cooperan** para asegurar una respuesta inmunológica óptima, de modo que los cambios que se produzcan con la edad en la inmunidad innata van a tener un impacto sobre el sistema inmunitario adaptativo, y viceversa (Lord et al., 2001; Solana et al., 2006; De la Fuente, 2008a; 2008b; Gomez et al., 2008). Estudios recientes han mostrado que los defectos a lo largo de la edad en la activación de las células T por LPS pueden deberse al requerimiento de contactos celulares con células presentadoras de antígeno viables, fundamentalmente macrófagos y células dendríticas, cuya capacidad para inducir proliferación de células T se encuentra disminuida en humanos y ratones de edad avanzada (Stout y Suttles, 2005; De la Rosa et al., 2006; Solana et al., 2006). También, la capacidad de los macrófagos de estimular la producción de IL-2 por parte de las células T está reducida en los ancianos (Zissel et al., 1999). Por el contrario, una presentación de antígeno bien conservada es predictor de salud y supervivencia, y constituye parte integrante del fenotipo de no riesgo extraído de estudios longitudinales en humanos octogenarios y nonagenarios, como veremos más adelante (De la Rosa et al., 2006). Además, las células dendríticas captan antígenos, de modo que se

produce su maduración y se polarizan a células dendríticas de tipo 1 (DC1) o de tipo 2 (DC2), dependiendo de su capacidad para favorecer la respuesta por parte de las células Th1 o Th2, respectivamente. Como se comentó anteriormente, investigaciones recientes sugieren que la respuesta de tipo Th1 es la predominante en adultos sanos normales, mientras que en ancianos frágiles predomina la Th2, con el correspondiente cambio en el perfil de citoquinas, lo que se ha sugerido como un mecanismo importante de la disfunción inmunitaria asociada a la edad, en el que podrían estar implicadas las células presentadoras de antígeno (Fig. 3) (Pawelec et al., 2002; Rafi et al., 2003). Donnini et al. (2002) estudiaron la funcionalidad de células presentadoras de antígeno maduras, obtenidas a partir del exudado peritoneal de ratones, tras cultivar las células con GM-CSF e IFN- γ , concluyendo que no mantenían su capacidad para estimular la actividad citotóxica ni la producción de IFN- γ por parte de las células T CD8+.

Finalmente, otros tipos celulares, como las células hematopoyéticas precursoras de leucocitos de sangre periférica (CD34+) también sufren los efectos del envejecimiento, disminuyendo con la edad tanto en humanos como en ratones. Este descenso se ha sugerido como marcador de envejecimiento (Bagnara et al., 2000).

En vista de todo lo anteriormente comentado, a pesar de la rápida acumulación de nuevos datos en torno a la inmunosenescencia, todavía no se conocen con seguridad todos los cambios a los que conduce el proceso de envejecimiento en los diferentes aspectos de la función inmunitaria, ni se comprende totalmente el papel específico que juega el sistema inmunológico en dicho proceso.

1.1.3.2. El sistema inmunitario como predictor de longevidad.

Del mismo modo que los individuos que presentan inmunosenescencia prematura a nivel de diversos parámetros mueren de manera temprana, se ha observado que los sujetos longevos son capaces de preservar tales parámetros, lo que confirma al sistema inmunológico como predictor de longevidad (Guayerbas et al., 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Puerto et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; De la Fuente y Miquel, 2009).

Es indudable que para un mejor conocimiento del envejecimiento en general, y de la inmunosenescencia en particular, es de gran interés el estudio de aquellos individuos que han logrado alcanzar edades cercanas a los límites de la vida máxima de su especie. Estos

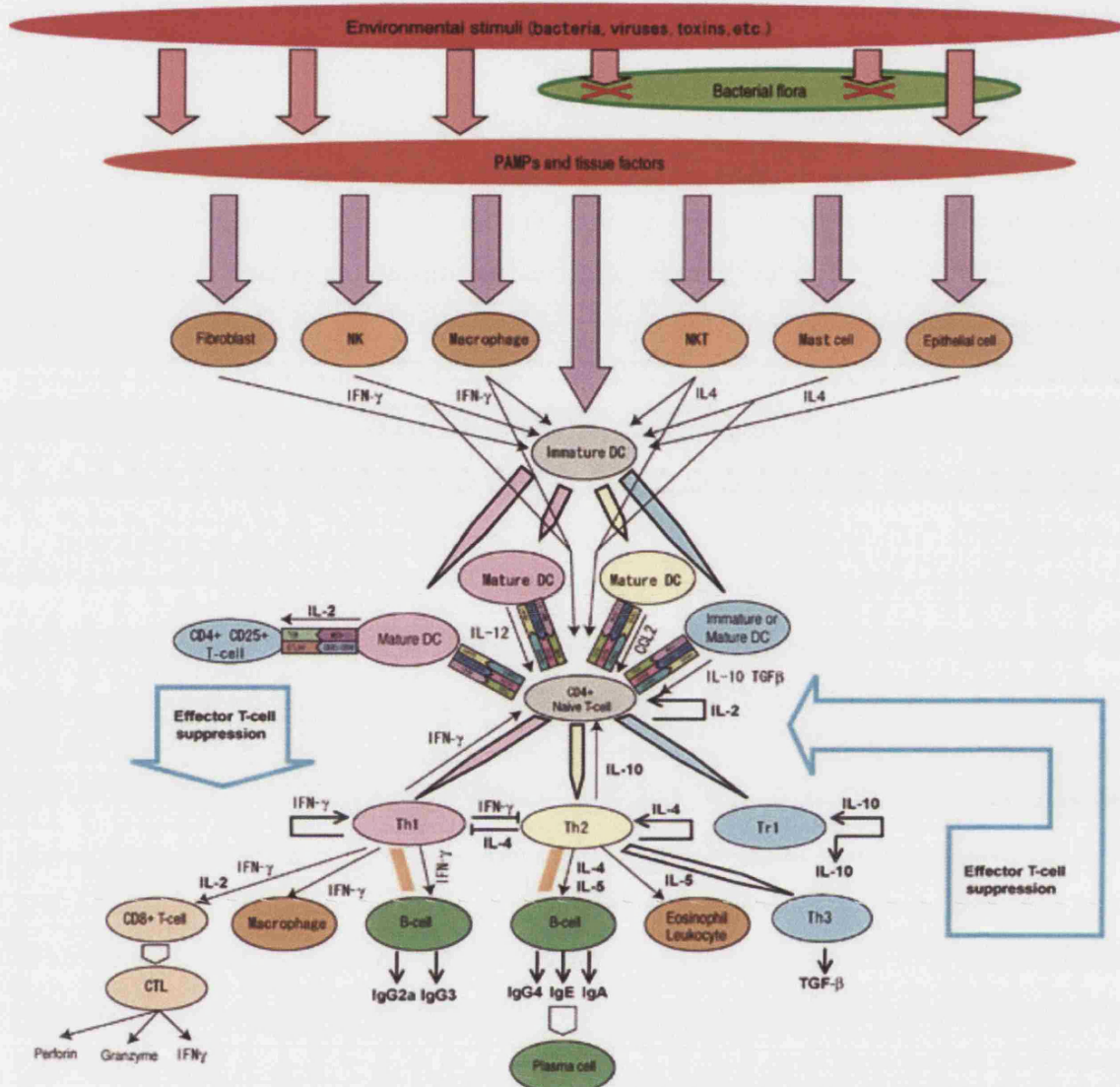


Figura 3. Arquitectura de las interacciones intercelulares del sistema inmunitario (Kitano y Oda, 2006). El centro de la red de interacciones lo suponen las células T CD4+. Varios estímulos de patógenos se transmiten a las células dendríticas (DC) que polarizan a las células T CD4+. Las células T CD4+ vírgenes se diferencian y liberan citoquinas efectoras para que se continúe la transmisión de la información. Todo el comportamiento de este subsistema se encuentra controlado por complejas transducciones de la señal, constituidas por la red de citoquinas. Tras el reconocimiento del complejo MHC-péptido apropiado y/o la recepción de estímulos de citoquinas, las células T CD4+ vírgenes polarizan hacia Th1, Th2 o Tr1 dependiendo de los estímulos de citoquinas que reciban, que son suministradas por las células DC polarizadas y por una variedad de células del sistema inmunitario innato. Las células Th1 se inducen a través de IFN- γ , IL-12 e IL-18, y secretan citoquinas como IFN- γ e IL-2, mientras que las Th2 se inducen a través de IL-4 y secretan IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 entre otras. Las citoquinas efectoras secretadas por parte de las células Th1 y Th2 afectan a múltiples tipos celulares. Por ejemplo, el IFN- γ activa a las células B para segregar IgG2a e IgG3, la IL-2 activa a los linfocitos T citotóxicos (CTL), e IL-4 e IFN- γ inhiben mutuamente el crecimiento de células Th1 y Th2 respectivamente. La IL-2 juega además un papel importante determinando la dinámica de la respuesta de las células T, puesto que promueve el crecimiento y la activación de células T CD4+ CD25+ reguladoras, que inhiben a las células T autorreactivas, ya sean Th1 o Th2. Entre las posibles fuentes de la IL-2 implicada en la activación de las células CD4+ CD25+ se encuentran las DC.

individuos longevos se consideran el paradigma del envejecimiento exitoso y su estudio ha contribuido al planteamiento de nuevas teorías sobre el envejecimiento entre las que destacan aquellas que implican al sistema inmunitario.

En estos individuos se han observado hechos sorprendentes como, por ejemplo, una capacidad linfoproliferativa preservada en respuesta a anti-CD3 (Sanson et al., 1997), PHA (Monti et al., 1992) y ConA (Puerto et al., 2005). También se ha comprobado que los precursores hematopoyéticos de leucocitos sanguíneos (CD34+) preservan su capacidad proliferativa y la respuesta a distintos factores de crecimiento, de forma más eficaz que en individuos viejos de menor edad (Bagnara et al., 2000).

Así pues, si las diferentes respuestas inmunitarias parecen verse afectadas de distinta forma por el proceso de envejecimiento disminuyendo, aumentando o manteniéndose al nivel de adultos (Fagnoni et al., 1996, 2000; Wack et al., 1998), existe una serie de parámetros inmunitarios bien preservados en los centenarios (Paganelli et al., 1992; Fagiolo et al., 1993; Sansoni et al., 1997; Bagnara et al., 2000; Alonso-Fernández et al., 2008) y en los animales de experimentación que alcanzan una elevada longevidad (Puerto et al., 2005). Por este motivo, se propuso la **teoría del remodelamiento**, totalmente compatible con la teoría de oxidación-inflamación, según la cual, la inmunosenescencia es el resultado neto de una adaptación continua por parte del organismo frente a los cambios deletéreos que se producen con el tiempo. La inmunosenescencia sería, por tanto, un proceso dinámico que incluiría tanto pérdidas como ganancias (Franceschi et al., 2000a). La clave, en este contexto, es la adaptación y, según esto, los centenarios serían aquellos con la mejor capacidad de adaptación a las agresiones internas y externas y en particular a las que inciden en el sistema inmunitario (Franceschi et al., 2000b). De hecho, algunos autores puntualizan que el organismo se encuentra en constante cambio y la propia homeostasis debe ser un proceso no estático, por el que el organismo se encuentra continuamente reaccionando frente a factores agresores y es capaz de preservar la salud a través de un equilibrio dinámico, lo que vino a denominarse de manera clásica "homeorresis" (Goya, 1999) y más recientemente "homeodinámica" (Rattan, 2000; 2008a; 2008b).

Dentro de esta teoría del remodelamiento, hay que tener en cuenta el punto de vista evolutivo, lo que Franceschi y sus colaboradores han denominado teoría evolutiva de la inmunosenescencia (Ottaviani y Franceschi, 1997). Según ella, el sistema inmunitario ha sido seleccionado para preservar la homeostasis corporal hasta la reproducción, manifestándose así hasta la edad adulta sus efectos beneficiosos frente a patógenos,

umores, etc. (Franceschi et al., 1999). En nuestros días, la esperanza de vida se ha incrementado notablemente y por lo tanto el sistema inmunitario tiene que seguir enfrentándose con toda una serie de retos inmunológicos no previstos por las fuerzas evolutivas. Desde este punto de vista, la mayoría de los trabajos indican que la inmunidad adquirida, más especializada y sofisticada, y también más reciente en términos evolutivos, es la que sufre el mayor deterioro con la edad, mientras que los mecanismos de la inmunidad innata, más antiguos y también menos específicos, están más preservados o incluso en ocasiones aumentados (Franceschi et al., 2000a; De la Fuente, 2008a; De la Fuente y Miquel, 2009).

Ese progresivo aumento en la estimulación de la inmunidad innata parece estar implicado en el estado pro-inflamatorio que acompaña al envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009), si bien se ha observado que este estatus puede ser compatible con una longevidad extrema (Baggio et al., 1998), siempre que no sea excesivo.

Como se ha comentado con anterioridad, en algunos aspectos de la respuesta inmunitaria, los individuos **longevos** han sido capaces de mantener una funcionalidad similar a la de adultos. Éste es el caso de la ya mencionada **capacidad linfoproliferativa** frente a distintos estímulos (Monti et al., 1992; Sansoni et al., 1997). Así, estudios recientes han mostrado que una función linfoproliferativa inducida por ConA y una presentación de antígeno bien conservadas junto con un mejor mantenimiento del ratio CD4/CD8 son algunos de los biomarcadores inmunitarios que constituyen el fenotipo inmunológico de no riesgo en humano, extraídos de estudios longitudinales en octogenarios y nonagenarios, que conduce a salud y supervivencia (De la Rosa et al., 2006). Colonna-Romano et al. (2002) indicaron que aunque el número absoluto de linfocitos T $\gamma\delta$ está reducido en centenarios, su capacidad de activación por LPS es similar a la de adultos. No obstante, trabajos previos de nuestro grupo de investigación encontraron una proliferación en respuesta a LPS de los leucocitos peritoneales de ratones longevos BALB/c reducida con respecto a los adultos, si bien este deterioro fue menor que en los viejos no seleccionados (Puerto et al., 2005). A pesar de ello, los niveles de TNF- α inducidos por LPS son similares en ambos, adultos y longevos (Puerto et al., 2005).

Por otra parte, las células mononucleares de sangre periférica de individuos longevos muestran una mayor resistencia, al igual que las procedentes de ancianos sanos, a la **apoptosis** inducida por estrés oxidativo (con 2-deoxi-D-ribosa), que las de los adultos (Monti et al., 2000). Es más, la tasa apoptótica global del organismo es menor en los

individuos centenarios en comparación con los adultos y los ancianos sanos. Esta resistencia frente a la apoptosis sería un marcador de adaptación a la exposición crónica al estrés oxidativo y parece estar asociada con una menor pérdida del glutatión (GSH) y, probablemente, una mayor eficacia en su reducción desde la forma oxidada (GSSG) en las células de centenarios. Otros autores han comprobado además, que existen diferencias en la expresión de algunas caspasas, de forma que en los individuos longevos el patrón de expresión se caracteriza por elevados niveles de caspasas 1 y 3 y bajos niveles de la caspasa 8, mientras que en los viejos no seleccionados de menor edad se observan elevados los niveles de esta última (Lacelle et al., 2002).

La **actividad NK** se encuentra preservada en individuos centenarios y en ratones longevos (Bonafé et al., 2001; 2002; Puerto et al., 2005). De hecho, una citotoxicidad NK preservada en el envejecimiento, que parece estar relacionada con un aumento en el número de células citotóxicas y a pesar de una cierta disminución en la función citotóxica por célula, es signo de salud y supervivencia (De la Rosa et al., 2006). Sin embargo, una actividad NK disminuida, a pesar del aumento en el número absoluto de células que realizan esta función, es parte del fenotipo inmunitario de riesgo y resulta en mayor morbilidad y mortalidad (De la Rosa et al., 2006).

En cuanto a las **células fagocíticas**, se ha descrito un elevado nivel de granulocitos, principalmente neutrófilos, en la sangre periférica de los centenarios. Estas células presentaron una mayor capacidad fagocítica y una menor generación de anión superóxido que las procedentes de individuos viejos de menor edad (Miyaji et al., 2000). También, un estudio reciente de nuestro grupo mostró en centenarios unos niveles funcionales de estas células semejantes a los de jóvenes de 25-35 años, hecho que se acompañaba de un contenido en glutatión intracelular similar a los adultos y una actividad de la enzima catalasa incluyo mayor que éstos (Alonso-Fernández et al., 2008).

Así pues, parece que la clave para alcanzar una mayor longevidad está, no tanto en un respuesta inmunitaria excesiva, que aporta una ventaja únicamente en el corto plazo, sino en unas capacidades inmunitarias suficientes (menores en intensidad, pero igualmente eficaces), que permitan la adaptación a largo plazo. Los centenarios no sería “los mejores” pero sí los “mejor adaptados” (Franceschi et al., 2000b). No obstante, en la actualidad, los mecanismos que permiten esta mejor adaptación por parte del sistema inmunitario en los individuos longevos permanecen sin esclarecer en su totalidad.

1.13.3. El estrés oxidativo, la inmunosenescencia y la longevidad.

En la base de la inmunosenescencia se encuentra la misma causa responsable de la senescencia de las otras células del organismo, esto es, el **estrés oxidativo** asociado al inevitable uso del oxígeno para la realización de las funciones celulares (De la Fuente, 2008a). Sin embargo, debemos considerar que las células inmunitarias necesitan de la producción de radicales libres y otros compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo sus funciones defensivas en el organismo, y tales compuestos en exceso pueden resultar dañinos no sólo para los propios leucocitos sino también para las células y tejidos próximos (Knight, 2000; Yoon et al., 2002; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008b). Además, las características de membrana de las células inmunitarias las hacen especialmente sensibles al daño por estrés oxidativo (Meydani et al., 1995). Por lo tanto, si todas las células del organismo necesitan mantener un equilibrio entre la producción de oxidantes y las **defensas antioxidantes** para prevenir un exceso de niveles de los primeros y el consecuente estrés oxidativo, el mantenimiento de este equilibrio es incluso más importante para las células inmunitarias, puesto que supone la preservación de su capacidad funcional, y por tanto, de la salud.

En este aspecto, nuestro grupo ha podido comprobar que las células inmunitarias peritoneales de ratón sufren un declive en defensas antioxidantes, tales como en los niveles de glutatión reducido y en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, y catalasa, mientras que los compuestos oxidantes, como el glutatión oxidado, y el daño a sus biomoléculas tales como lípidos y ADN, aumentan a lo largo del envejecimiento (De la Fuente et al., 2004a; 2005; De la Fuente, 2008a; 2008b). También hemos encontrado un aumento del estrés oxidativo en el bazo y en los leucocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos, que sufren de ansiedad crónica, así como en ratones machos en comparación con las hembras (Alvarado et al., 2006a; Viveros et al., 2007; De la Fuente y Miquel, 2009). En contraste, como se comentó con anterioridad, los neutrófilos de centenarios presentan un contenido en glutatión intracelular similar a los adultos y una actividad de la enzima catalasa incluso mayor que éstos (Alonso-Fernández et al., 2008).

Además, el estrés oxidativo y la **inflamación** se encuentran fuertemente relacionados, puesto que es bien sabido que el exceso de radicales libres puede inducir la respuesta inflamatoria, y es más, los radicales libres en sí mismos son efectores de la

inflamación (Kulinsky, 2007). De hecho, en la actualidad se considera que muchas patologías asociadas al envejecimiento, como la hipertensión y la disfunción endotelial (De la Fuente et al., 2005; Csiszar et al., 2008), la aterosclerosis (Lobby, 2007) y las enfermedades neurodegenerativas (Yuan et al., 2007), incluyen en su patogénesis no sólo procesos oxidativos, sino también un componente inflamatorio.

En estudios realizados en humano, se ha observado que niveles circulantes de marcadores proinflamatorios, tales como el TNF- α , da lugar a fragilidad y discapacidad en personas mayores y está asociado a demencia, invalidez funcional y alto riesgo de mortalidad (Mooradian et al., 1991; De Martinis et al., 2006). El TNF- α se ha vinculado con enfermedades como el Alzheimer y la cardiopatía isquémica (Franceschi et al., 2001; De Martinis et al., 2006). También, los niveles de enzimas y moléculas proinflamatorias, tales como la ciclooxygenasa 2, varias citoquinas y prostaglandinas, parecen encontrarse aumentadas en el envejecimiento (Chung et al., 2006). Por ejemplo, la prostaglandina E2 aparece aumentada en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales procedentes de viejos (De la Fuente, 2004a). Es más, el aumento de los componentes inflamatorios puede explicar algunos aspectos de la inmunosenescencia (Meydani y Wu, 2007). En contraste, estudios recientes han mostrado menor expresión de genes que resultan en inflamación y oxidación en centenarios (Capri et al., 2006). De esta forma, el equilibrio entre los componentes proinflamatorios, necesarios para hacer frente a los patógenos y cruciales para la supervivencia del organismo, y los marcadores antiinflamatorios, se hace también fundamental para una respuesta inmunitaria adecuada, el mantenimiento de la salud y el envejecimiento saludable (Franceschi, 2007; Ostan et al., 2008). En este sentido, genotipos asociados a una elevada producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β o la IL-6 han sido asociados con menor supervivencia o menor probabilidad de alcanzar la longevidad extrema (Cederholm et al., 2007; Di Bona et al., 2009), mientras que los asociados a alta producción de citoquinas antiinflamatorias, tales como la IL-10, se han descrito como marcadores específicos de longevidad (Lio et al., 2002).

Los mecanismos que se encuentran en la base del mantenimiento de la respuesta inmunitaria y el estrés oxidativo controlado a lo largo del envejecimiento saludable permanecen sin esclarecer. El **NF- κ B** destaca como potencial mediador de los efectos de la inflamación y el estrés oxidativo sobre la función inmunitaria a lo largo de la edad (Salminen et al., 2008). Este factor de transcripción es ubicuo, y se sabe que es activado por citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , y por condiciones oxidativas, y en

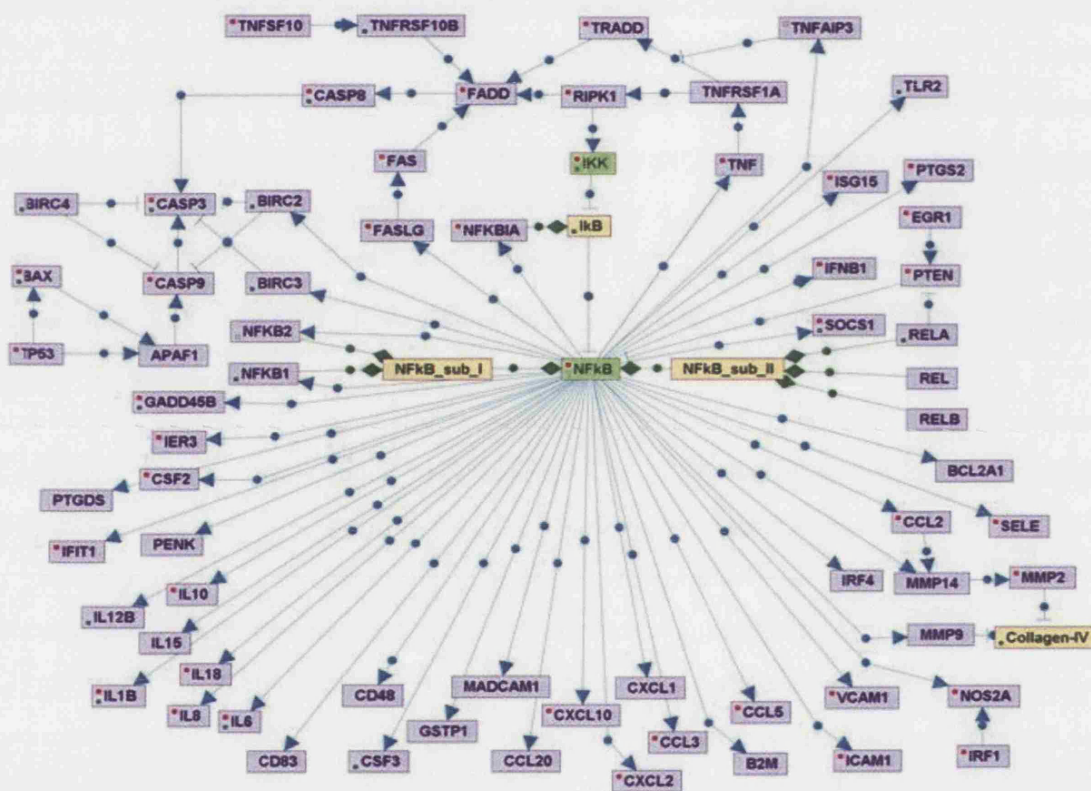


Figura 4. Compleja señalización mediada por NFκB. La activación del NFκB conduce a la expresión de una amplia variedad de genes con efectos opuestos y determinantes para la funcionalidad y respuesta celular, incluyendo aquéllos que codifican para multitud de citoquinas pro- y anti-inflamatorias así como otros mediadores de inflamación, quimioquinas, moléculas de adhesión, mediadores de proliferación y de muerte.

La activación excesiva de esta vía se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades asociadas al envejecimiento, como por ejemplo la aterosclerosis (Ginn-Pease y Whisler, 1998), con muchos procesos de inflamación crónica, incluyendo la esclerosis múltiple (Merrill y Beveniste, 1996; Barnes y Karin, 1997), y con un aumento de la mortalidad en modelos de shock endotóxico letal agudo (Víctor y De la Fuente, 2003).

También, en estos últimos se observó que el NF κ B era regulado a la baja por precursores del glutathione, que así previenen de la oxidación y la inflamación excesivas (Víctor y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003a). No obstante, la activación del NF κ B ha sido escasamente estudiada en leucocitos a lo largo del envejecimiento, y los pocos estudios sobre el tema han encontrado resultados contradictorios, en parte debidos a las diferentes condiciones de estimulación (Trebilcock y Ponnappan, 1996; Chung et al., 2006). Por otra parte, la activación de esta ruta en leucocitos de longevos no se conoce en absoluto.

Los **receptores de tipo Toll (TLRs)** también median su señalización a través de la activación de factores de transcripción como el NF κ B (Fig. 5). El papel clave de los TLRs como mediadores de la detección y respuesta de las células inmunitarias a patógenos invasores es bien conocido. En mamíferos, existen al menos 13 TLRs, que dependiendo de su disposición en la membrana celular, reconocen distintos patrones moleculares asociados a patógenos derivados de varios microorganismos, incluyendo bacterias, virus, protozoos y hongos (Kawai y Akira, 2007). De este modo, a pesar de la convergencia entre las cascadas de señalización iniciadas por diferentes TLRs, existe una amplia diversidad de respuestas funcionales a su activación. En concreto, TLR-4 es esencial para el desarrollo efectivo de la respuesta inmunitaria frente al LPS de las bacterias Gram-negativas, y junto con el TLR-2, constituye el principal receptor para el reconocimiento de una variedad de componentes de las paredes celulares bacterianas (Hirschfeld et al., 2000).

Se ha encontrado expresión de TLRs en varios tipos celulares inmunitarios de mamíferos, tales como células B (Gerondakis et al., 2007), mastocitos (Iwamura y Nakayama, 2008), células NK (Eriksson et al., 2006), células T reguladoras (Sutmoller et al., 2007), macrófagos, monocitos, células dendríticas (Kaisho y Akira, 2006), neutrófilos (Sabroe y Whyte, 2007) y basófilos (Yoshimoto y Nakanishi, 2006). Así, por ejemplo, algunos autores han descrito que la unión del TLR-4 a sus ligandos controla y coordina la división y la supervivencia o muerte de las células B a través de la vía del NF κ B (Gerondakis et al., 2007). No obstante, su expresión a lo largo del envejecimiento o la longevidad en estos tipos celulares ha sido escasamente estudiada.

Por otra parte, se ha observado activación de TLRs en células gliales y en linfocitos que se infiltran en el sistema nervioso en respuesta a agentes infecciosos, daño tisular o condiciones autoinmunes (Okun et al., 2009). De este modo, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias o moléculas de adhesión por parte de las células inmunitarias,

los TLRs pueden dañar indirectamente a las neuronas en condiciones como la isquemia o la esclerosis múltiple.

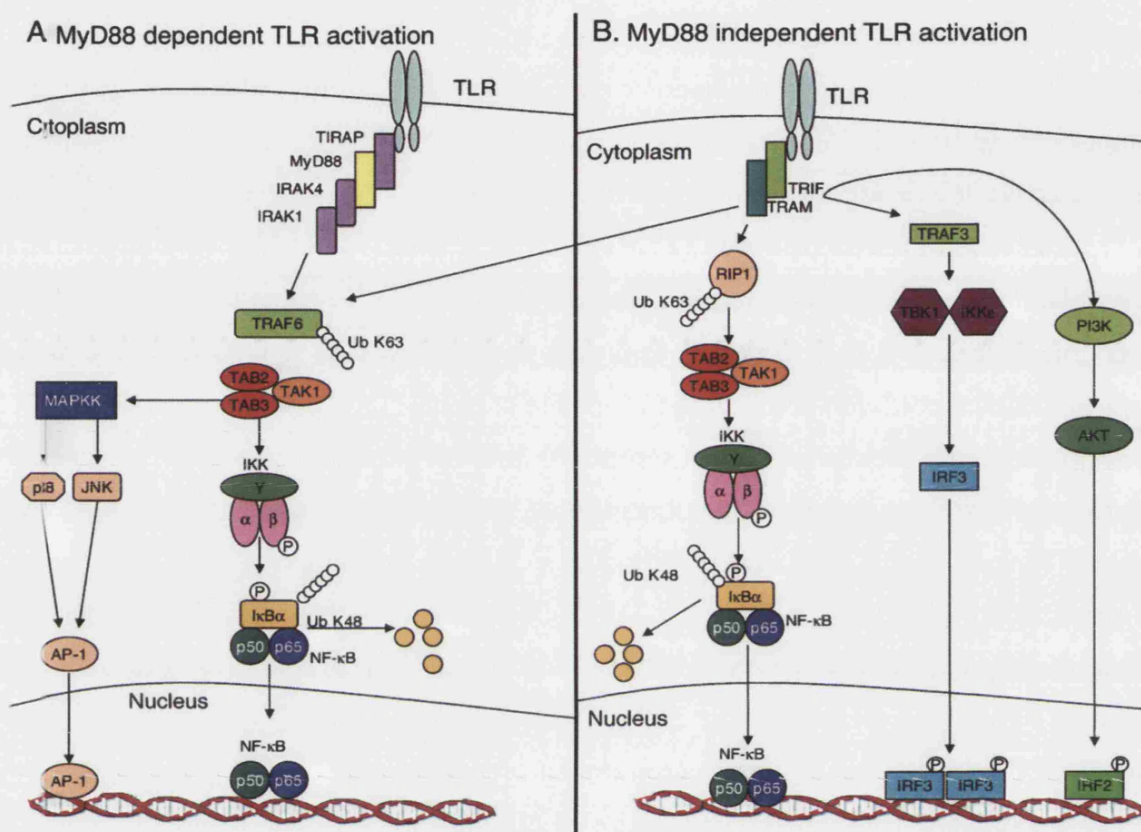


Figura 5. Señalización mediada por TLRs (Okun et al., 2009). Después del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, los TLRs activan la cascada de señalización celular que resulta en la necesaria respuesta inmunitaria requerida para la defensa del organismo ante éstos. Las rutas de señalización activadas por TLRs se clasifican comúnmente en dependientes o independientes del Factor de Diferenciación Midoide 88 (MyD88), dado que ésta es la proteína adaptadora universal reclutada por todos los TLRs con excepción del TLR3. A) La ruta dependiente de MyD88 activa dos cascadas de señalización que incluyen al complejo IKK y a la familia de las MAP kinasas. El complejo IKK determina la fosforilación de las proteínas IκB que se degradan, lo que resulta en la translocación al núcleo del NFκB. Los miembros de las MAPK fosforilan y activan a la proteína activadora 1 (AP-1). La activación de ambos factores de transcripción conduce a la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF-α. B) TLR-3 y TLR-4 son capaces de realizar su señalización a través de una ruta independiente de MyD-88. Mediante ésta, la activación de TLR-4 culmina en la señalización por MAPK, activación del NFκB y del factor regulador del interferón 3 (IRF3), y en la producción de IFN de tipo I.

Además, estudios recientes indican que los TLRs tienen la capacidad de unirse a diversos ligandos endógenos (Pandey y Agrawal, 2006), entre los que se encuentran las lipoproteínas oxidadas de baja densidad, implicadas en la aterosclerosis, y el péptido Aβ, clave en la enfermedad de Alzheimer (Fassbender et al., 2004; Mullick et al., 2006). De

hecho, la activación de TLRs promueve degeneración neuronal en modelos experimentales de Alzheimer (Okun et al., 2009).

No obstante lo comentado, el potencial papel mediador de los TLRs en los efectos de la inflamación y el estrés oxidativo sobre la función inmunitaria a lo largo del envejecimiento, permanece sin esclarecer.

1.1.3.4. La comunicación neuro-inmuno-endocrina en el envejecimiento y la pérdida de la homeostasis.

La homeostasis corporal es imprescindible para la supervivencia de los organismos. Para el mantenimiento de la misma, varios sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, coordinan sus actividades con el fin de obtener una respuesta eficaz ante cualquier variación en los medios interno o externo. La existencia de esta **comunicación neuroinmunoendocrina** es conocida desde tiempo atrás, datando los primeros estudios del año 1927, cuando Sir Thomas Lewis apunta la existencia de una relación entre los tres sistemas. Asimismo, los estudios realizados por Hans Selye (1936) demuestran como el estrés causa atrofia del timo e hipertrofia de las glándulas adrenales. A estos primeros estudios les siguen toda una serie de trabajos en los que se confirman tales interacciones y se abandona la idea inicial de una actividad reguladora autónoma propia de cada sistema.

El sistema nervioso autónomo (SNA) inerva todos los órganos linfoides, ya sean primarios o secundarios, alcanzando tanto los vasos como el parénquima de los mismos (Felten et al., 1987; Felten y Felten, 1991; Friedman e Irwin, 1997). Por su parte, las células inmunitarias presentan una amplia gama de receptores específicos que les permiten recibir la información aportada por el sistema nervioso (Felten y Felten, 1991; Madden y Livnat, 1991; Berczi et al., 1996). La importancia de dicha inervación se ve especialmente reflejada en el hecho de que lesiones en el ámbito nervioso provocan alteraciones de la función inmunitaria (Roszman et al., 1985; del Rey et al., 2002). Además, se ha postulado que el desarrollo óptimo de los órganos linfoides depende, al menos en parte, de la presencia local de factores nerviosos (Ackerman et al., 1987; Bulloch et al., 1987).

Además de los mediadores del sistema nervioso, también los del endocrino pueden ejercer sus efectos sobre el sistema inmunitario. De esta forma, distintas hormonas pueden alcanzar a las células inmunitarias y modificar su funcionalidad, puesto que poseen receptores específicos para dichas sustancias (Kaschka, 1997). Del mismo modo, factores

creados por las células inmunitarias, las citoquinas, pueden ejercer su acción sobre las células nerviosas y endocrinas debido a la presencia de receptores para dichos factores en estas células (Koenig, 1991).

El descubrimiento de que las células inmunitarias producían sustancias asociadas a situaciones de estrés, previamente descritas como propias de los sistemas nervioso y endocrino, marca uno de los hallazgos más importantes de la biología. Anteriormente, el sistema inmunitario era considerado un sistema regulador propio y autónomo, si bien posteriormente se ha asumido que junto con el sistema neuroendocrino forma un círculo integrado de información en el que se comparten ligandos y receptores. De este modo, se ha comprobado que las células inmunitarias son capaces de sintetizar neurotransmisores y hormonas como, por ejemplo, la hormona adenocorticotropa (ACTH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona del crecimiento (GH), entre otras (Blalock, 1989). Dada la poca cantidad de estas sustancias que produce el sistema inmunitario, su efecto suele ser autocrino o paracrino más que endocrino, pero no por ello menos importante, puesto que permite completar la regulación y comunicación establecida entre los tres sistemas (Gaillard, 1994; Savino y Dardenne, 1995).

Considerando todo ello, surge la idea de una comunicación bidireccional entre estos tres sistemas reguladores (Blalock, 1989; Besedovsky y del Rey, 1996) y se establece el concepto de comunicación neuroinmunoendocrina.

Por otra parte, como un hecho que favorece esta comunicación, se encuentra el que las células inmunitarias, gracias a un elaborado sistema de recirculación, migran desde el torrente sanguíneo a los tejidos y de éstos al sistema linfático, cerrando el círculo. Esto hace posible el contacto de las células del sistema inmunitario no sólo con los posibles patógenos sino también con los productos derivados de los otros dos sistemas.

Todas aquellas situaciones capaces de alterar la homeostasis corporal serán reconocidas, en este contexto de bidireccionalidad, por uno u otro sistema, comunicando los cambios recibidos a los demás, para así, recuperar el equilibrio perdido. Así, el sistema inmunitario se podría considerar como un sistema capaz de percibir estímulos “no cognoscitivos”, como virus, bacterias o células tumorales, entre otros, creando una respuesta inmunitaria que se traduce en forma de citoquinas, modulando éstas no sólo a propio sistema inmunitario sino también al neuroendocrino. Éste a su vez, reconocerá estímulos “cognoscitivos”, que serían transformados en información en forma de

neurotransmisores, hormonas u otros factores y reconocidos así por el sistema inmunitario, provocándose una serie de cambios en el funcionamiento del mismo (Blalock, 1984).

Por tanto, los tres sistemas se encuentran anatómica y funcionalmente interconectados, residiendo la base de la comunicación neuroinmunoendocrina en la existencia de receptores y de un lenguaje compartido entre todos ellos (Blalock et al., 1985; Blalock, 1989; 1994; Besedovsky y del Rey, 1996; 2001), suministrándose así las bases para una integración bidireccional.

Como se ha comentado con anterioridad, las células del sistema inmunitario producen toda una serie de sustancias que forman parte del mecanismo de defensa diseñado para interaccionar entre si y protegernos de los agentes extraños; las citoquinas. Estas **citoquinas** tienen además un **efecto modulador sobre el sistema neuroendocrino**, el cual posee receptores para dichas sustancias, pudiendo éstas regular la acción y secreción de varias hormonas y neurotransmisores e incluso modificar procesos sensoriales, emotivos y cognitivos (Koenig, 1991; Maier y Watkins, 2003).

Ya en 1977, Besedovsky y Sorkin, comprobaron que la actividad neuronal en el núcleo ventromedial del hipotálamo se incrementaba al alcanzarse el pico en la respuesta de anticuerpos tras una inmunización. La idea de que los mediadores inmunitarios, como las citoquinas pro-inflamatorias (especialmente IL-1 α y β , IL-6 y TNF- α), son elementos clave en los procesos de señalización en el cerebro durante una infección, se ha ido estableciendo desde entonces (Besedovsky et al., 1985; Besedovsky y del Rey, 1996; Maier et al., 2001). Esas citoquinas han sido las más estudiadas, y están implicadas también en procesos de dolor, concretamente, de dolor crónico o neuropático puesto que la lesión en un nervio atrae y activa a las células del sistema inmunitario y a las células gliales, exacerbando ese dolor. Este mecanismo se produce principalmente a nivel espinal, no cerebral (Chacur et al., 2001; Milligan et al., 2001, 2003).

Los mecanismos clásicos que permiten a las citoquinas llegar al cerebro, son principalmente cuatro:

1. El transporte activo. Banks (2001), comprobó que la IL-1 α atraviesa la barrera hematoencefálica a través de un sistema de transporte saturable. Parece que otras citoquinas como la IL-1 β , la IL-6 o el TNF- α podrían emplear sistemas similares.
2. Atravesando zonas donde no existe una buena barrera hematoencefálica, como el plexo coroideo o los órganos circunventriculares. Una vez allí, se activarían toda una serie de segundos mensajeros que enviarían la información a zonas más alejadas (Blatteis, 1992).

Además, se ha comprobado que la IL-1 β es capaz de inducir, en células tipo macrófago del plexo coroideo, las meninges y los órganos circunventriculares, la producción de más IL-1 β , que actuaría allí de forma paracrina y activaría, entre otras, a las células gliales, para la producción de más citoquinas (Quan et al., 1998; Konsman et al., 1999), consiguiéndose así un efecto amplificador.

3. Uniéndose a receptores del endotelio de los vasos cerebrales. De nuevo se induciría la liberación de segundos mensajeros y toda una cascada de señales (Rivest, 1999).

4. A través del nervio vago. Éste inerva los ganglios linfáticos y tiene fibras eferentes que envían señales desde la periferia al sistema nervioso central (SNC). Se han encontrado receptores para IL-1 en las fibras vagales, y una alta densidad de células dendríticas, que constitutivamente expresan IL-1 β , en los alrededores de las mismas (Goehler et al., 1999).

Además de acceder al SNC desde la periferia, se ha comprobado que estas citoquinas se expresan tanto en la médula espinal como en el cerebro, de forma fisiológica (Vukovic et al., 2000; Maier et al., 2001). Las primeras evidencias de la presencia de IL-1 β y TNF- α en el cerebro se produjeron hace ya algunas décadas (Breder et al., 1988; Plata-Salman et al., 1988), aunque inicialmente se pensó que esta presencia era debida a procesos infecciosos o inflamatorios o a otras alteraciones que implicaran al sistema inmunitario. Posteriormente, esta visión ha sido revisada puesto que se ha observado que esta expresión de citoquinas se mantiene en ausencia de estímulos patológicos. Así, las citoquinas no serían simples mediadores inflamatorios sino que podrían estar implicadas en los procesos fisiológicos del cerebro.

En este sentido, algunos autores han señalado que estas citoquinas podrían interferir en procesos cognitivos como la formación de la memoria (Pugh et al., 2001; Harbuz, 2003), pero otros indican que, en determinadas zonas, son necesarios ciertos niveles de las mismas para mantener la plasticidad sináptica (Zhao y Schwartz, 1998; Beattie et al., 2002).

En cuanto a la IL-1 y el TNF- α , las citoquinas más estudiadas, numerosos autores han descrito su presencia en el cerebro de ratas, ratones y humanos (Wesselingh et al., 1993; Gabellec et al., 1996, 1999; Ignatowski et al., 1997; Taishi et al., 1998). Parece ser que la principal fuente de estas citoquinas en el cerebro son las células gliales (van Dam et al., 1992), aunque también son producidas por ciertas neuronas. Éstas son reguladas por acetilcolina e histamina, que inhiben la producción, o por dopamina y factor liberador de corticotropina (CRF), que la estimulan (Tringali et al., 1997). No obstante, estudios más

recientes han apuntado que el cerebro no es el órgano inmunológicamente privilegiado que se consideraba en el pasado, de manera que los linfocitos periféricos pueden penetrar, realizar sus funciones, incluyendo la liberación de citoquinas, en el parénquima de un cerebro normal (Stichel y Luebbert, 2007).

Las acciones de estas citoquinas son numerosas y complejas actuando a diversos niveles.

Uno de los efectos más conocidos de la IL-1 es su capacidad para inducir fiebre (Kluger et al., 1998; Maier y Watkins, 2003). También está implicada en los patrones de comportamiento durante la enfermedad (apatía, falta de motivación social, depresión...) (Dantzer et al., 1998), en el apetito (Plata-Salaman et al., 1988) y en el sueño (Krueger et al., 1998); proceso en el que también participa el TNF- α (Krueger et al., 1998).

Además, se ha observado que todas estas citoquinas proinflamatorias regulan la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). En general, parece que su efecto predominante es activar dicho eje y suprimir el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y el hipotálamo-hipófisis-gónadas, así como la liberación de GH (Turnbull y Rivier, 1999; Bumiller et al., 1999). Concretamente, la IL-1 β es un potente activador del eje HHA (Chesnokova y Melmed, 2002) puesto que una inyección intravenosa de la misma, en ratas, es capaz de elevar los niveles plasmáticos de ACTH mediante la estimulación de la producción de CRF a nivel cerebral (Uehara et al., 1987; Payne et al., 1994). Efectos similares se obtuvieron con inyecciones intracerebroventriculares (Brown et al., 1991). De hecho, se ha descrito que la IL-1 β estimula directamente a las neuronas productoras de CRF hipotalámicas (Ericsson et al., 1994). En cuanto a otras citoquinas, la IL-6 comparte muchos de sus efectos con la IL-1, teniendo ambas en ocasiones un efecto sinérgico sobre el eje HHA (Zhou et al., 1996). La IL-3 es capaz de estimular la secreción basal de cortisol con igual potencia que la IL-6 (Weber et al., 1997; Michl et al., 2000).

La IL-1 β y el TNF- α influyen en la actividad neuronal, siendo capaces de inactivar a las neuronas glucosa-sensibles del hipotálamo de manera específica (Plata-Salaman et al., 1998). Por otra parte, se ha descrito un efecto directo de la IL-1 β sobre neuronas del hipocampo, modificando su actividad electrofisiológica (Vitkovic et al., 2000). Se ha comprobado, además, que la IL-1 β es capaz de estimular la síntesis y liberación de vasopresina por parte de las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico hipotalámicos (Diana et al., 1999) y que activa la tasa de recambio de la noradrenalina en esta región cerebral. Este efecto parece estar mediado por el CRF y los eicosanoides (Terao

et al., 1993). En relación al TNF- α , algunos de los efectos encontrados incluyen la inhibición de la liberación de noradrenalina en la eminencia media (Elenkov et al., 1992) y el hipocampo (Ignatowski et al., 1997). Parece ser que esta citoquina actúa modificando la permeabilidad de canales iónicos, aumentando el flujo de K⁺ en neuronas corticales (Houzen et al., 1997) y modulando el de Ca⁺² en neuronas de SNS (Soliven y Albert, 1992). Tanto la IL-1 β como el TNF- α inducen proliferación en los astrocitos (Barna et al., 1990) y la microglía (Thery y Mallart, 1993), pero aún no está claro si su papel puede llegar a ser perjudicial. Se han descrito tanto efectos tóxicos como beneficiosos, especialmente en el caso del TNF- α , que puede inducir muerte neuronal por apoptosis (Holmin y Mathiesen, 2000), y daño a oligodendrocitos, con destrucción de la vaina de mielina (Stoll et al., 1993; Wang y Shuaib, 2002), pero también puede tener efectos neurotróficos (Cheng et al., 1994; Jankowsky y Patterson, 2001).

La **regulación neuroendocrina sobre el sistema inmunitario** tiene también un papel importante en la homeostasis corporal, y se lleva a cabo por mediadores característicos de los sistemas nervioso y endocrino, que están en contacto con las células inmunitarias. La amplia inervación noradrenérgica y peptidérgica que reciben los tejidos linfoides, así como su vascularización, hacen posible este contacto (Bellinger et al., 1992), junto con la presencia de receptores en las células inmunitarias para los productos nerviosos y endocrinos (Kaschka, 1997). De las numerosas hormonas y neurotransmisores conocidos, sólo algunos han sido especialmente estudiados en cuanto a su posible efecto modulador sobre el sistema inmunitario. Estos mediadores modifican tanto la actividad como el metabolismo de las células inmunitarias.

Los órganos linfoides están principalmente inervados por fibras simpáticas, que liberan noradrenalina (NA) y neuropéptido Y (NPY), siendo ambos **neurotransmisores** los que tienen un papel preponderante en la modulación del sistema inmunitario por el SNS (Elenkov et al., 2000). No obstante, además de éstos, en los órganos linfoides se liberan otros factores, entre los que cabe destacar la acetilcolina, serotonina, dopamina, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, somatostatina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, adenosina o neuroquinina A.

Los efectos de cada uno de estos neurotransmisores sobre un tipo concreto de célula inmunitaria son variados y complejos, y van a depender de factores como el número, afinidad y subtipo de receptores presentes en las mismas. Centrándonos, dada su importancia, en el papel modulador de la NA sobre la función inmunitaria, los primeros

estudios se dirigieron a conocer los efectos del estrés sobre el tráfico de los leucocitos de sangre periférica en humanos. Este control se pone de manifiesto en dos etapas. En un primer momento, de forma aguda (<30 min), se produce un aumento de los mismos, en especial de las células NK y CD8+, sin afectar demasiado a linfocitos B y CD4+. En situaciones de estrés crónico, sin embargo, se observa el efecto contrario, es decir, una reducción significativa de los leucocitos sanguíneos, principalmente de las células NK y CD8+ (Benschop et al., 1996). Otros de los efectos más conocidos de la NA sobre la funcionalidad de los linfocitos, en concreto de los T, consisten en la inhibición de su capacidad proliferativa en respuesta a mitógenos así como de la liberación de IL-2 (Bartik et al., 1993; Ramer-Quinn et al., 2000). También, se ha comprobado que la NA puede favorecer la diferenciación hacia Th2, de forma indirecta a través de monocitos, macrófagos y otras células presentadoras. Así, la NA provoca una disminución en la producción de IL-12 y un aumento en la de IL-10, favoreciendo un microambiente propicio para la diferenciación de los Th0 hacia Th2 (Elenkov et al., 1996; Panina-Bordignon et al., 1997).

Las **hormonas** modulan la función inmunitaria de diversas formas, y aunque la mayoría de ellas tienen efectos diferentes según la función o la célula inmunitaria estudiada, podemos dividir las según sus efectos generales o más relevantes, en hormonas de carácter estimulador, inhibidor o indiferente (Straub et al., 2000). Dentro de las primeras, se puede incluir a la tiroxina, la prolactina (PRL) o la GH. Entre las más inhibidoras estarían los glucocorticoides. Todas estas hormonas son liberadas desde diferentes glándulas, controladas por el hipotálamo y la hipófisis, estableciéndose una serie de ejes funcionales entre los que cabe destacar al eje HHA. Éste, media las respuestas del organismo frente a situaciones de estrés, y su activación desencadena la liberación de numerosas hormonas, que a su vez modifican profundamente la función inmunitaria (Petrovsky, 2001). Entre ellas destacan los glucocorticoides, cuyo carácter inmunosupresor es conocido desde hace tiempo (Hoffman, 1993; Caldenhoven et al., 1995), pero también otras como la PRL, las hormonas tiroideas o la GH, cuyos efectos de carácter estimulador tienden a contrarrestar la inmunosupresión inducida por los glucocorticoides (Kruger, 1996; Davis, 1998). De este modo se establece una compleja red de interacciones entre los sistemas endocrino e inmunitario. En la tabla 2 se resumen algunos de los efectos más relevantes de distintas hormonas sobre la función inmunitaria.

Introducción

Tabla 2. Hormonas y su efecto sobre la función inmunitaria. (adaptada de Petrovsky, 2001). HT: Hormonas tiroideas; GH: Hormona del crecimiento; PRL: Prolactina; MEL: Melatonina; DHEA: Dehidroepiandrosterona; ESTROG: Estrógenos; ACTH: Hormona adenocorticotropa; GC: Glucocorticoides; ENDORF: Endorfinas.

HORMONA	PRINCIPALES EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO
HT	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Células T y la producción de IL-2, GM-CSF e Igs (Provinciali et al., 1992; Straub et al., 2000; Petrovsky, 2001). ↑ Fagocitosis, actividad NK y producción de ROS, IL-6 y citoquinas Th1 (Provinciali et al., 1992; Straub et al., 2000).
GH	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferación de linfocitos T y B y la capacidad presentadora de antígeno de células dendríticas (Murphy y Longo, 2000; Straub et al., 2000; Baeza et al., 2008; 2009). ↑ Actividad de macrófagos y la producción de H₂O₂ (Warwick-Davies et al., 1995). ↑ Actividad NK y la producción de ROS, IL-1, IL-2, TNF-α e IgG2 (Straub et al., 2000; Baeza et al., 2008; 2009). ↓ Producción de citoquinas Th2 y la apoptosis de células T (Straub et al., 2000; Jeay et al., 2000).
PRL	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferación de células T y B, la actividad NK y la producción de IFN-γ, IL-2r, ROS, TNF-α, IL-6, IL-1 e Igs (Straub et al., 2000; McMurray, 2001; Vera-Lastra et al., 2002). ↑ Activación de la PKC (McMurray, 2001; Vera-Lastra et al., 2002).
MEL	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferación de células B y T y la producción de IL-1, IL-2, IL-6 e IFN-γ (Cutolo et al., 1999; Straub et al., 2000; Baeza et al., 2009). ↑ Actividad NK (Baeza et al., 2009). ↓ Fagocitosis y producción de ROS (Straub et al., 2000).
DHEA	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferación células T y producción de IL-2 e IFN-γ (Piccini et al., 1995; Verthelyi, 2001). ↑ Citoquinas Th1 (Straub et al., 2000). ↓ Producción de ROS, TNF-α, IL-6, Igs y citoquinas Th2 (Straub et al., 2000).
ESTROG	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proliferación células B y producción de IL-1, IL-5, IL-6, IL-10 e Igs (Straub et al., 2000; McMurray, 2001; Verthelyi, 2001). ↑ / ↓ Actividad NK (Sorachi et al., 1993; Straub et al., 2000; De la Fuente et al., 2004b; Baeza et al., 2009). ↑ / ↓ Proliferación de células T, quimiotaxis, fagocitosis y producción de IL-2 y TNF-α (Ahmed et al., 1993; Straub et al., 2000; McMurray, 2001; De la Fuente et al., 2004b; Baeza et al., 2009).
ACTH	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Producción de IFN-γ e Igs (Johnson et al., 1984, 1992). ↓ Activación de macrófagos por IFN-γ (Johnson et al., 1984, 1992). ↑ Actividad de células NK (Johnson et al., 1992).
GC	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Expresión de ICAM-1 y E-selectina (Caldenhoven et al., 1995). ↓ Actividad de linfocitos T y B, fagocitosis, actividad NK y producción de ROS (Bischof y Melms, 1998; Straub et al., 2000). ↓ Producción de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN-γ y TNF-α (Almawi et al., 1996; Fushimi et al., 1998; Straub et al., 2000). ↓ Producción de PGE₂ y NO (Riccardi et al., 2002). ↓ Apoptosis inducida por Fas-FasL (Yang et al., 1995). ↑ Producción de TGF-β (Batuman et al., 1995). ↑ Apoptosis en células T diferenciadas (Wienstein et al., 1998). ↑ Expresión de receptores para IL-1, IL-2, IL-6 e IFN-γ (Almawi et al., 1996).
ENDORF	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Proliferación de células T, producción de ROS y la adhesión a fibronectina (Mandler et al., 1986; Azuma et al., 2002). ↑ Capacidad quimiotáctica de neutrófilos, la actividad NK y la producción de IFN-γ (Mandler et al., 1986; Azuma et al., 2002).

Además, existe un fuerte dimorfismo sexual en esta comunicación neuroinmunoendocrina, y así, los estrógenos se han sugerido como responsables de la mayor inmunocompetencia de las hembras (Keller et al., 2001; De la Fuente et al., 2004b), que muestran respuestas tanto humorales como celulares más potentes que los machos (Weinstein et al., 1984; De la Fuente et al., 2004b), lo que podría jugar un papel importante en su mayor esperanza de vida. Otros factores comportamentales y fisiológicos podrán contribuir a esta distinta longevidad entre sexos. Por ejemplo, las conductas de riesgo y de búsqueda de emociones son rasgos mucho más frecuentes en machos que en hembras (Rosenblitt et al., 2001), y el cortisol o la corticosterona se encuentran inversamente relacionadas con las conductas de riesgo (Mazur, 1995), siendo las concentraciones plasmáticas de estas hormonas considerablemente más altas en las hembras que en los machos adultos (Atkinson y Waddell, 1997; Stefanski y Grüner, 2006), hecho que también se cree relacionado con los niveles de estrógenos (Burgess y Handa, 1992).

Por tanto, los sistemas inmunitario, endocrino y nervioso interaccionan entre sí a través de citoquinas, hormonas y neurotransmisores, dependiendo esta comunicación de receptores y rutas de señalización específicos en las células diana.

Con el **envejecimiento** se producen cambios en muchos de los niveles de esta red de comunicación debidos a multitud de causas como puede ser el daño oxidativo, defectos mitocondriales o acortamiento de telómeros, entre otras. Estas alteraciones tienen lugar en cada uno de los sistemas reguladores y en su comunicación, ya que al afectarse uno de ellos lo hacen también los otros, puesto que están interconectados (Fabris, 1991). La **teoría neuroendocrina** del envejecimiento (Everitt y Burgess, 1976; Frolkis, 1982; Meites et al., 1986) se basó en que la gran mayoría de las funciones del organismo están reguladas por el sistema neuroendocrino; esta compleja red sufre un deterioro progresivo con el envejecimiento; y el deterioro intrínseco en este sistema y cualquier fallo del mismo es perjudicial y crítico para la longevidad, debido a la alta importancia del sistema neuroendocrino respecto de otras funciones del organismo. Además, en base a las interacciones existentes entre el sistema neuroendocrino y el inmunitario, se propuso que las alteraciones en esta comunicación que se producen con el paso del tiempo, serían las responsables de la mayoría de las disfunciones fisiológicas asociadas al envejecimiento (Fabris, 1991), puesto que conducirían a una pérdida de la homeostasis y una menor resistencia al estrés. En efecto, dada la importancia que tienen los sistemas neuroendocrino e inmunitario en la regulación de todos los procesos fisiológicos, no es sorprendente que

han sido uno de los focos de atención en los referente a formular conceptos teóricos sobre el envejecimiento, aunque no pueden explicar la causa del mismo (Strehler, 2000).

Con el envejecimiento, los tipos y niveles de **citoquinas** que entran en contacto con las células de los sistemas nervioso y endocrino cambian. No sería de extrañar por tanto que el aumento asociado a la edad en las citoquinas proinflamatorias y compuestos oxidantes producidos por las células inmunitarias (De la Fuente et al., 2005), pudiera tener un fuerte impacto sobre la función nerviosa (Merrill, 2001). Así, algunos autores han sugerido ya acerca del posible impacto de la acumulación progresiva de linfocitos T a lo largo del envejecimiento normal en áreas cerebrales como el hipocampo sobre el progresivo declive cognitivo con la edad (Stichel y Luebbert, 2007). Los autores de dicho estudio localizaron las células T preferentemente en áreas perivasculares, indicativo de su reclutamiento de fuentes sistémicas (Stichel y Luebbert, 2007).

Con respecto al **SNS**, se ha podido comprobar que la respuesta simpática aumenta con la edad, lo que supone unos mayores niveles de NA en la circulación, aunque parece ser que los niveles de NPY no se modifican con el envejecimiento (Hetland et al., 1991; Straub et al., 2000). Según otros autores, sin embargo, se produce un aumento de los niveles plasmáticos no sólo de la NA sino también del NPY con la edad (Friedman e Irvin, 1997).

Centrándonos en el caso del **sistema endocrino**, se producen cambios en prácticamente todas las hormonas, que incluyen tanto aumentos como disminuciones de las mismas.

Algunas de las hormonas cuyos niveles disminuyen al envejecer incluyen a la androstenediona, la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su forma sulfatada (DHEAS), la progesterona, la aldosterona, el estradiol y la testosterona (Parker, 1999; Perry, 1999). Parece ser que, en el caso de la DHEA, este descenso está asociado con algunas enfermedades que se producen en la vejez (Williams, 2000; Ledochowski et al., 2001) y que podría deberse al estrés oxidativo que acompaña a los procesos de envejecimiento (Moriyama et al., 2000). También se observa un descenso en los niveles de GH, del factor de crecimiento tipo insulina (IGF), de vitamina D y de calcitonina, lo que supone que en el envejecimiento se produce una regulación deficiente del Ca^{+2} (Straub et al., 2001).

Entre las hormonas cuyos niveles aumentan al envejecer se encuentra hormona paratiroidea, lo que contribuye a dichas alteraciones en la regulación del Ca^{+2} (Straub et al., 2001). También, la hormona LH, la hormona estimulante del folículo (FSH), así como el

cortisol, cuyo aumento se observa en relación con el resto de hormonas adrenales, lo que podría entenderse como un mecanismo compensatorio de la glándula adrenal para mantener la síntesis de esta hormona a expensas de las hormonas esteroideas (Straub et al., 2000, 2001).

Estos cambios en el sistema nervioso y endocrino al envejecer afectan globalmente a los otros sistemas homeostáticos. Así, se ha podido comprobar que el descenso de la DHEA que se produce con el envejecimiento provoca un aumento en los niveles de IL-6 y que su administración en individuos viejos produce una disminución en la liberación de esta citoquina (Daynes et al., 1993), correlacionándose negativamente los niveles de ambas sustancias (Straub et al., 1998).

Además, en ancianas sanas se ha observado también que unos niveles elevados de IL-6 junto con bajas concentraciones de 17β estradiol en plasma, son los responsables del descenso relativo del cortisol respecto de la ACTH que se observa en las mujeres con la edad, lo que podría explicar su mayor susceptibilidad frente a las enfermedades inflamatorias (Zietz et al., 2001). De hecho, algunos autores afirman que los niveles de cortisol disminuyen con la edad únicamente en las hembras (Zietz et al., 2001), mientras que se encuentran menos desregulados en hombres que en mujeres de edad avanzada (Walston y Fried, 1999).

Por otro lado, como se ha comentado, con la edad se produce un desplazamiento de la respuesta inmunitaria hacia respuestas de tipo Th2, fenómeno en el que podrían estar implicados tanto el cortisol como la NA, cuyos niveles plasmáticos aumentan al envejecer si no se diferencia por sexos (Wilder, 1998; Straub et al., 2001).

El sistema inmunitario en las hembras no sólo trabaja de modo más eficiente y efectivo que el de los machos, sino que además su función se mantiene durante más tiempo en aquéllas (Aspinall, 2000). Se ha visto que los estrógenos son capaces de potenciar la expresión de enzimas antioxidantes, lo que resulta en niveles aumentados de glutathion reducido (Borrás et al., 2007), que podrían preservar la función inmunitaria a lo largo del envejecimiento (Guayervas et al., 2004; De la Fuente et al., 2004b; 2005).

Por otra parte, con la edad se producen cambios en la innervación e irrigación de los órganos inmunitarios, en la afinidad y en el número de receptores para hormonas y neurotransmisores presentes en los leucocitos, así como en las señales intracelulares que desencadenan, dando lugar a cambios en la respuesta por parte de las células inmunitarias (Bellinger et al., 2001; De la Fuente et al., 2001; Puerto et al., 2005). Así, por ejemplo, la

eficacia antiinflamatoria de los glucocorticoides se encuentra reducida con la edad (Landfield et al., 2007). También, nuestro grupo ha comprobado que la respuesta *in vitro* por parte de las células inmunitarias a una amplia variedad de concentraciones de distintos neurotransmisores cambia con dependencia de la edad de los sujetos (De la Fuente y Medina, 2005; Puerto et al., 2005). Esto demuestra que, en el caso hipotético de que los niveles de neurotransmisores que alcanzan a las células inmunitarias se mantuviese con la edad, la respuesta de éstas podría ser diferente.

De este modo, las alteraciones que se producen al envejecer en la red de comunicación formada por los tres sistemas; nervioso, endocrino, e inmunitario, conducen a un deterioro progresivo y sistemático, que afecta a la capacidad los mismos para mantener al homeostasis, pudiendo contribuir así al progreso del envejecimiento y a la mayor morbilidad y mortalidad asociadas a la edad (De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008b).

Una de las manifestaciones más evidentes de esta **pérdida de capacidad homeostática** consiste en diversas **anomalías en la respuesta frente a las situaciones de estrés**, tanto físico como psicológico, que se producen durante el envejecimiento normal (Pedersen et al., 2001). Parece ser que el principal responsable de este fenómeno es el eje HHA, puesto que su capacidad de respuesta frente a los estímulos estresantes está alterada y también lo están los mecanismos de retroalimentación que se encargan de la regulación de este eje (Gust et al., 2000; Revskoy y Redei, 2000; Pedersen et al., 2001). De manera interesante, la retroalimentación negativa de los glucocorticoides aparece reducida en la vejez y en ambos sexos (Wilkinson et al., 2001). Por otra parte, una respuesta inadecuada frente al estrés se ha comprobado como un factor importante que conduce a una aceleración del proceso de envejecimiento y se acompaña de una funcionalidad pobre tanto del sistema inmunitario como de los otros sistemas fisiológicos (McEwen et al., 2006; Eauer, 2008; Gouin et al., 2008). En este sentido, nuestro grupo ha podido comprobar, como se ha venido comentando, que los ratones que muestran un exceso de reactividad al estrés y una ansiedad crónica, sufren de una inmunosenescencia prematura, así como de un deterioro en la respuesta conductual y endocrina, y envejecen y mueren de manera prematura (Guayrbas et al., 2002a; 2002b; Guayrbas y De la Fuente, 2003; Viveros et al., 2007; De la Fuente y Giménez-Llort, 2009).

Es difícil determinar si a lo largo del envejecimiento los cambios neuroendocrinos conducen al deterioro inmunológico o si el proceso se produce a la inversa, de modo que

un sistema inmunitario alterado induce los cambios neuroendocrinos. Algunos autores opinan que lo más probable es que ambos mecanismos acontezcan simultáneamente (Bellinger et al., 2001). No obstante, teniendo en cuenta que la capacidad para mantener la homeostasis es fundamental para mantener un buen estado de salud, el estudio de las alteraciones en la red que forman los tres sistemas reguladores con el envejecimiento, es de gran interés a la hora de abordar cualquier intervención terapéutica dirigida a mejorar la calidad de vida de los individuos.

1.1.4. Papel del sistema inmunitario en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento: la enfermedad de Alzheimer.

La neurobiología del envejecimiento ha sido una de las áreas de mayor expansión científica a lo largo de las dos últimas décadas. Hasta la fecha, se han dedicado grandes esfuerzos científicos a la comprensión de los mecanismos neuronales que se encuentran en la base de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, cuya prevalencia en ancianos se encuentra aumentada de modo dramático en paralelo al aumento de la esperanza de vida y del envejecimiento de las sociedades. Éste es el caso de la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad neurodegenerativa y causa de demencia senil más frecuente, que se presenta con complejos síntomas neuropsiquiátricos, y es en la actualidad diana de numerosas investigaciones clínicas y básicas.

Los principales sellos patológicos de la AD a nivel cerebral son agregados de proteínas aberrantes, placas amiloides constituidas por el péptido amiloide β ($A\beta$), y ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada. Otros cambios neurodegenerativos incluyen disfunción neuronal y sináptica progresiva, y finalmente, la muerte neuronal (DeKosky y Scheff, 1990; Terry et al., 1991; Dringenberg, 2000). También, es un hecho destacado en el cerebro con AD, el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico, en el que se encuentra implicado un exceso de activación por parte de la microglia y los astrocitos (McGeer et al., 1988; Akiyama et al., 2000; Sasaki et al., 2002; Eikelenboom et al., 2006), lo que también se ha observado en modelos animales de la enfermedad (Kitazawa et al., 2005). Por otra parte, déficits colinérgicos y un estrés oxidativo aumentado explican algunos aspectos relevantes del complejo patrón patológico que se observa en la AD (Mattson, 2004).

La reproducción de los déficits neuronales y conductuales del Alzheimer en modelos animales ha sido todo un reto para la ciencia (Giménez-Llort et al., 2007). Sin embargo, los avances en el conocimiento de las bases genéticas de la forma familiar de la AD de establecimiento temprano y de los factores de riesgo implicados en los casos esporádicos (Selkoe, 2000), junto con el desarrollo de la tecnología de transferencia génica, han proporcionado finalmente valiosos modelos animales que complementan las aproximaciones colinérgicas tradicionales para el estudio de los déficits de aprendizaje y de memoria resultado de la pérdida colinérgica (Bartus, 2000). Estos modelos animales desarrollados mediante técnicas de transferencia génica han hecho posible el estudio de la sobreexpresión en roedores de los genes que codifican para la proteína precursora amiloide (APP) y para la presenilina-1 (PS1) y PS2 mutantes humanas, encontrándose varias mutaciones en estos genes que han sido identificadas como causa de AD familiar autosómica dominante (Mattson, 2004). De hecho, los primeros intentos destinados a reproducir la patología tipo AD en ratones transgénicos se fundaron en el estudio del envejecimiento prematuro acompañado de patología tipo AD, hecho que se desarrolla por los pacientes con síndrome de Down, sugiriendo un posible papel de la sobreexpresión de APP, codificada en el cromosoma 21 (Lai y Williams, 1989). Desde entonces, se han desarrollado varios modelos animales transgénicos de AD basados en la expresión de transgenes mutantes familiares de AD (Janus y Westaway, 2001).

Un gran avance se alcanzó en el año 2003 (Oddo et al., 2003a), cuando el laboratorio del Profesor Frank M. LaFerla, en la Universidad Irvine de California, logró el desarrollo del modelo de ratón 3xTg-AD, los primeros ratones triple-transgénicos que albergan los transgenes *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} y *tau*_{P301L}. Este modelo animal mimetiza tanto la neuropatología amiloide como la tau que se producen en los enfermos de AD, y esto lo hace además en una manera dependiente de la edad y en las regiones cerebrales relevantes de la enfermedad, como es el hipocampo, revelando la importancia de la acumulación intraneuronal de A β oligomérico en la etiopatogénesis de la enfermedad (Oddo et al., 2003a). Los ratones 3xTg-AD presentan déficits sinápticos y colinérgicos (Oddo et al., 2003a; 2003b; 2005), el característico perfil inflamatorio de gliosis reactiva (Kitazawa et al., 2005), así como el deterioro cognitivo (Billings et al., 2005) y conductas similares a los síntomas psicológicos y comportamentales de demencia (BPSD) que presentan los enfermos de AD, incluyendo falta de habilidad para afrontar situaciones que suponen un estrés, incluso si éste es moderado (Giménez-Llort et al., 2007). De hecho, en este sentido,

se ha descrito una hipercortisolemia moderada en los pacientes con Alzheimer (Hartmann et al., 1997).

Como ya se ha comentado, de entre los varios factores implicados en la patogénesis de la AD, gran cantidad de evidencias respaldan la hipótesis de una contribución directa de la respuesta inflamatoria en la progresión de las placas amiloides, y por tanto, en la neurodegeneración asociada a la enfermedad. Así, se ha descrito que el A β se muestra como un agente proinflamatorio (Giovannini et al., 2002; Streit, 2002), por lo que la neuroinflamación en el cerebro con AD se concentra alrededor de los agregados de A β (Akiyama et al., 2000; McGeer et al., 2006). De acuerdo con esto, se han formulado hipótesis que infieren en la disfunción microglial, basadas en células microgliales reactivas, que producen neurotoxinas en respuesta a la exposición a A β , y activan la respuesta inmunitaria innata en la AD (Streit, 2002; Okun et al., 2009). De este modo, aparecen en el cerebro con AD niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 y TNF- α , y quimioquinas, así como un mayor estrés oxidativo y contenido en compuestos nitrogenados y proteasas, todo ello derivado de la activación glial que contribuye a exacerbar la patología (Akiyama et al., 2000; Grammas y O'vase, 2002; McGeer et al., 2006). Además, también indicativo de un papel patofisiológico que tiene la inflamación en la AD, se ha descrito la presencia en esas áreas de proteínas de fase aguda y de toda la cascada del complemento (Mrak et al., 1995; Hüll et al., 1996; Tarkowski et al., 1999). No obstante, a pesar de considerarse a los astrocitos y, especialmente, a la microglia activados como las principales fuentes locales de componentes inflamatorios (Akiyama et al., 2000), se ha descrito también que los linfocitos T circulantes son capaces de penetrar en el parénquima cerebral y contribuir en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Marx et al., 1998).

Con respecto al sistema inmunitario fuera del cerebro, algunos autores han sugerido la existencia de una respuesta general empobrecida por parte de las células inmunitarias ante diversos estímulos, con el declive de la actividad fagocítica como un evento temprano de la cadena patogénica (Richartz et al., 2005). Otros estudios indican que los pacientes de Alzheimer podrían mostrar un fenotipo proinflamatorio hereditable de inmunidad, produciendo en consecuencia mayores niveles de citoquinas proinflamatorias y/o menores de citoquinas antiinflamatorias que los sujetos control sin demencia de su misma edad. Así, los sujetos que presentan una relación IL-1 β /IL-10 elevada en sangre presentan 13 veces más probabilidades de sufrir demencia, lo que sugiere que la determinación del perfil de citoquinas mediante ensayos de sangre total puede tener un valor predictivo en la AD

(Remarque et al., 2001). Los pacientes con AD muestran elevados niveles de TNF- α plasmático (Zuliani et al., 2007; Bonotis et al., 2008), y de hecho, los niveles circulantes de TNF- α se relacionan directamente con la severidad de la enfermedad (Paganelli et al., 2002). Por otra parte, estudios genéticos revelan que los polimorfismos de IL-1 e IL-6 asociados a altos niveles de citoquinas se encuentran enriquecidos en los pacientes con AD (Papassotiropoulos et al., 1999; Grimaldi et al., 2000; Nicoll et al., 2000), pero la relativa baja frecuencia de tales variantes génicas no puede explicar el perfil inflamatorio que subyace al desarrollo de la AD en la población global (Remarque et al., 2001). También, algunos autores han sugerido que una menor proliferación de los linfocitos periféricos en respuesta a estímulos se correlaciona con una mayor gravedad de la enfermedad (Shalit et al., 1995). No obstante, existe cierta discrepancia en cuanto a los hallazgos encontrados en el sistema inmunitario sistémico, si bien ésta puede ser mayoritariamente atribuida a variaciones técnicas, a diferencias en los criterios de inclusión y en la fase de demencia en que se encuentran los sujetos, y a la influencia de la existencia de comorbilidad y del uso de tratamientos farmacológicos.

Por tanto, a pesar de que los datos son escasos, preliminares y en algunos casos contradictorios, especialmente con respecto a los cambios en la respuesta inmunológica que presentan los individuos con esta patología, todos estos hechos evidencian un papel clave del sistema inmunitario en la etiopatogénesis de la AD, aunque este papel causal no se encuentra bien establecido. Es más, el papel clave del sistema inmunológico en el envejecimiento concuerda con su posible papel en esa enfermedad (Fig. 6). Por otra parte, estudios epidemiológicos demuestran que la edad avanzada es el factor de riesgo más consistente para el padecimiento de Alzheimer (Mattson, 2004). De este modo, dado que el deterioro de la respuesta inmunitaria con la edad puede ser considerado como un factor patogénicamente relevante en la AD, la inmunosenescencia debe ser considerada para comprender el desarrollo de esta patología. De hecho, la contribución de una inmunosenescencia prematura en la patología de Alzheimer ha sido ya sugerida por Richartz et al. (2005).

Por otra parte, más de 20 estudios epidemiológicos sugieren los beneficios potenciales de las intervenciones antiinflamatorias sistémicas para retrasar el establecimiento y ralentizar la progresión de la AD (McGeer et al., 1988; Breitner et al., 1994; Akiyama et al., 2000), probablemente gracias a la reducción de la carga amiloide (Cirrito et al., 2003). En paralelo, se ha demostrado recientemente, en ratones 3xTg-AD,

que el tratamiento profiláctico con ibuprofeno reduce el A β oligomérico intraneuronal y los déficits cognitivos, y previene la inmunorreactividad de tau hiperfosforilada (McKee et al., 2008). También, se ha descrito que la inmunización con A β reduce los oligómeros de A β en el cerebro de ratones 3xTg-AD (Tseng et al., 2004) y en otros modelos transgénicos (Schenk et al., 1999), evidenciando la participación periférica en la eliminación del A β cerebral (Lemere et al., 2003).

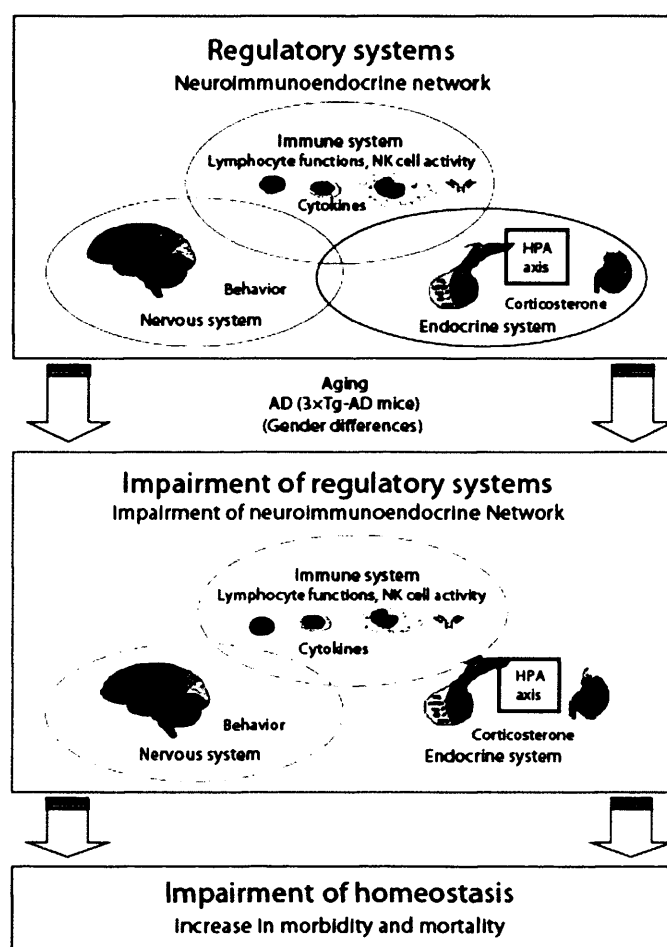


Figura 6. Sistemas reguladores y envejecimiento (Giménez-Llort et al., 2008). Los cambios en el sistema inmunitario con el envejecimiento así como los observados en individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer (AD) apuntan hacia la posible contribución de una inmunosenescencia prematura en el desarrollo de dicha enfermedad. Con el envejecimiento y enfermedades asociadas al mismo, como es la AD, se produce un deterioro de los sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, así como de su comunicación. Las alteraciones en los sistemas reguladores con la edad muestran diferencias sexuales, que han sido escasamente exploradas en la AD. El deterioro de la red neuroinmunoendocrina conduce a la pérdida de la homeostasis y al aumento de la morbilidad y mortalidad.

1.2. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.

La longevidad de los seres vivos ha sido ampliamente investigada por científicos a nivel mundial y, desde hace muchos siglos, los seres humanos han tenido entre sus inquietudes el cómo prolongar su vida. El cómo extender la vida humana en un tiempo muy superior al promedio general es una cuestión de gran interés desde muy diversos puntos de vista, que ha de plantearse desde el conocimiento de los mecanismos que subyacen al propio proceso de envejecimiento. ¿Cuáles son los componentes estructurales y los mecanismos fisiológicos determinantes del proceso de envejecimiento y la longevidad? ¿Cuál es el papel que juegan estos mecanismos en la aparición de las enfermedades asociadas con la edad como, por ejemplo, la diabetes, la aterosclerosis, o las enfermedades neurodegenerativas? ¿Cuánto más puede extenderse la expectativa de vida humana? Hasta el momento se ha venido comentando los datos de que se dispone hasta la fecha para contestar a las dos primeras preguntas. Lo que se sabe en relación al último aspecto es que la longevidad de cada especie con vida está contenida en su patrimonio genético: algunas moscas viven unos días; los ratones 3 años; la ballena azul 80 años; las tortugas marinas 200 años o más; una persona al menos hasta 122 años, si nos atenemos a la experiencia de Jeanne Calment, la francesa que ostenta el récord de mayor longevidad humana demostrada.

Es importante tener en cuenta la diferencia existente entre los términos longevidad media y longevidad máxima, pues se trata de dos conceptos que, aunque ligados, son distintos. La longevidad media o esperanza de vida se refiere a los años promedio que un individuo puede llegar a vivir por pertenecer a una población específica. Por ejemplo, en el caso de los seres humanos, no tiene la misma esperanza de vida, a priori, un individuo nacido en Europa que uno nacido en África. Por su parte, la longevidad máxima es la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta. Existe un acuerdo general de que el efecto de la herencia en la esperanza de vida media de los individuos es bajo (aproximadamente el 33% en humanos), mientras que la variabilidad restante se atribuye principalmente al ambiente. Por el contrario, la longevidad máxima de las diferentes especies animales se encuentra principalmente bajo el control del genoma.

En dos siglos y medio, la esperanza de vida al nacer en los países desarrollados ha pasado de menos de 30 a más de 80 años. Las proyecciones demográficas actuales dibujan

un escenario para el 2025 en el estado español con más de 8 millones de personas de más de 65 años y una expectativa de vida en el momento del nacimiento de más de 82 años. Este éxito de nuestra sociedad, debido muy especialmente a los avances de la medicina en muy diversos ámbitos plantea, a su vez, un gran número de retos sanitarios y socioeconómicos, ya que con la edad aumenta, como hemos visto, la frecuencia de enfermedades metabólicas y degenerativas. Las enfermedades degenerativas que acompañan al envejecimiento es la línea preferente de estudio en el campo de la geriatría, y el envejecimiento saludable es la meta principal tanto de ésta como de la gerontología.

Por tanto, las intervenciones al proceso de senescencia se centran fundamentalmente en tres niveles: 1) enlentecimiento del envejecimiento biológico, 2) supresión de las enfermedades o patologías asociadas con la edad y, 3) modulación de la interacción entre ambas. Todas ellas estarían dirigidas a retrasar el declive funcional y a aumentar la resistencia a la enfermedad, con el consiguiente aumento en la supervivencia.

Las estrategias clásicas para intervenir en el proceso de envejecimiento y en las enfermedades asociadas al mismo, que han mostrado resultados favorables en animales de experimentación y en humanos, incluyen: la restricción calórica y proteica, que inciden disminuyendo la tasa mitocondrial de producción de ROS; hecho que hasta el momento se ha mostrado como la única intervención eficaz para, según los investigadores, aumentar la longevidad máxima (Weindruch y Sohal, 1997; Masoro, 2000; Gredilla et al., 2001a, 2001b; Caro et al., 2008), la suplementación con cantidades adecuadas de antioxidantes (Guayerbas et al., 2004; 2005; Alvarado et al., 2005; 2006a; 2006b; Álvarez, 2006; Álvarez et al., 2006; De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008), la administración de niveles adecuados de diversas hormonas (Rudman et al., 1991; Svec y Porter, 1998; Yaffe et al., 1998; Baeza et al., 2008; 2009), y el ejercicio físico, practicado de manera habitual y moderada (Ferrández y De la Fuente, 1996; De la Fuente et al., 2005).

1.2.1. La suplementación con antioxidantes.

La suplementación con cantidades apropiadas de antioxidantes es, junto con la restricción, una intervención potencialmente útil en el contexto de la teoría de los radicales libres o de la oxidación. Esta estrategia se ha mostrado eficaz en la protección del organismo frente al estrés oxidativo, ayudando a mantener la salud y aumentando la esperanza de vida media en roedores (De la Fuente, 2002; 2008a; 2008b; De la Fuente y

Miquel, 2009). La literatura acerca de los efectos de las suplementaciones con antioxidantes en animales de experimentación y humanos es extensa, y aunque existen resultados contradictorios, éstos parecen deberse a factores como la edad de los sujetos estudiados y, principalmente, las dosis así como las condiciones de experimentación empleadas, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en poblaciones muy particulares (Mitchell et al., 2003).

No obstante, las dosis adecuadas de antioxidantes se han manifestado eficaces, en multitud de estudios, para incidir de manera relevante en el envejecimiento del sistema inmunitario. Como se ha descrito con anterioridad, dado que las células inmunitarias son una fuente importante de compuestos oxidantes y proinflamatorios, ambos deben encontrarse bajo el control exhaustivo de las defensas antioxidantes, ya que niveles aumentados de esos compuestos pueden dañar no sólo a las propias células que los producen, también a las que forman parte de los tejidos vecinos. Por otra parte, el déficit en antioxidantes ha sido asociado al declive en las respuestas inmunológicas, lo que a su vez conduce a infecciones graves y frecuentes que resultan en un aumento en la mortalidad (Knight, 2000).

Así, por ejemplo, se ha observado que la administración de antioxidantes como las vitaminas C y E, y los polifenoles, entre otros, mejoran parámetros inmunitarios descritos como marcadores de edad biológica y disminuyen el estrés oxidativo de los leucocitos, tanto en humanos como en ratones de edades avanzadas, y también en ratones que presentan envejecimiento prematuro (De la Fuente, 2002; Alvarado et al., 2006a; Álvarez et al., 2006; De la Fuente et al., 2008). Incluso los animales adultos se benefician de esta suplementación (De la Fuente, 2008a; 2008b), lo que parece estar relacionado con el agotamiento de las reservas antioxidantes de los leucocitos en la realización de sus funciones, también en edades tempranas (Hernanz et al., 1990).

En este contexto es necesario tener en cuenta que, dentro de las defensas antioxidantes endógenas, el glutatión (GSH) es el antioxidante tiólico no enzimático más importante que presenta el organismo para prevenir del estrés oxidativo en la mayoría de las células, tejidos y órganos (Dröge, 2002b). Este compuesto se requiere para eliminar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa, que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). Así, el cociente glutatión oxidado / glutatión reducido (GSSG/GSH) es un importante indicador del estado redox

celular (Sies, 1999), que se encuentra implicado en respuestas tan vitales para el sistema inmunitario como la proliferación o la apoptosis (Ginn-Pease y Whisler, 1998).

El glutathion es además esencial para la célula puesto que interviene en numerosas funciones como la síntesis de proteínas y ADN, el transporte de aminoácidos al interior de la célula, el mantenimiento de los grupos tiólicos intracelulares, la reducción enzimática del dehidroascorbato y la eliminación de compuestos tóxicos (Cotgreave y Gerdes, 1998). De esta forma, se ha demostrado que la pérdida, incluso a nivel moderado, de las reservas intracelulares de glutathion tiene dramáticas consecuencias para una variedad de funciones linfocitarias, siendo especialmente sensibles las dependientes de IL-2 (Dröge et al., 1994).

Por otra parte, el envejecimiento va acompañado de la disminución en este contenido en glutathion, lo que ha sido observado en numerosas células y tejidos, incluyendo a algunos componentes del sistema inmunológico (Hernanz et al., 2000). Además del cambio en el estado redox celular, con el declive del contenido en GSH intracelular, a lo largo de la edad se produce una disminución en la concentración plasmática de cisteína. Tales cambios parecen jugar un papel clave en los procesos y enfermedades que limitan la esperanza de vida humana, lo que ha llevado a algunos autores a denominar el envejecimiento como un síndrome de deficiencia en cisteína (Dröge, 2002b; 2002c; 2005).

En este contexto, la administración exógena de compuestos tiólicos podría tener efectos beneficiosos mejorando el declive en la función inmunitaria asociado a la vejez. No obstante, dado que el glutathion no penetra con facilidad al interior celular, sino que es sintetizado intracelularmente, su administración directa no es un procedimiento eficaz para aumentar los niveles de tioles intracelulares (Puri y Meister, 1983). De esta forma, la administración de precursores del glutathion, como la **N-acetilcisteína (NAC)**, podría resultar mucho más efectiva que la suplementación directa con glutathion o con otros tipos de antioxidantes no relacionados con el mismo. Estos antioxidantes, como la NAC, no sólo pueden neutralizar radicales libres de forma directa (Gressier et al., 1994), también, y especialmente, participan en la recuperación de las reservas de glutathion (De Flora et al., 1991).

La N-acetilcisteína (NAC) es un compuesto bien documentado en medicina. En humanos, su volumen de distribución es 0,33 l/kg, su aclaramiento renal es 0,21 l/h/kg y su vida media es de 2,27 h (Borgström et al., 1986). Se trata de un derivado sintético de una forma acetilada del aminoácido cisteína, la cual es sintetizada de forma natural en el hombre (Borgström et al., 1986). Este antioxidante tiólico es mucho más estable que la

cisteína. Un estudio comparativo de la NAC con otros compuestos derivados de cisteína reveló que solamente el 16% de la NAC se oxida en el estómago, en contraste con dichos compuestos con cisteína, que sufren un 75-100% de oxidación (Bonahomi y Gazzaniga, 1980).

La capacidad antioxidante de la NAC está claramente demostrada (Aruoma et al., 1989). La NAC neutraliza directamente radicales hidroxilo y ácido hipocloroso producidos en procesos inflamatorios (Gressier et al., 1994). Como se ha comentado con anterioridad, es además precursor de la síntesis de glutatión (De Flora et al., 1991), y también estimula la actividad de la enzima glutatión reductasa, que cataliza la regeneración del tripéptido. En algunos tipos celulares, como los macrófagos alveolares, se ha observado que la NAC estimula a las enzimas detoxificantes (GSH S-transferasas, diaforasas, etc) (De Flora et al., 1995), y protege a estas células del daño citogenético causado por agentes tóxicos como el benzopireno y el tabaco (Gandy et al., 1992). Además, en hepatocitos, se ha descrito que actúa como protector frente a los efectos deletéreos de la cocaína, aumentando significativamente los niveles de ARNm de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa (Zaragoza et al., 2000).

Es bien sabido que la NAC reduce la activación de NF- κ B, que como ya se ha descrito, puede ser desencadenada por varios factores entre los que destacan las ROS y las condiciones inflamatorias. De este modo, ha demostrado ser una buena terapia antiinflamatoria en episodios de fuerte inflamación, como la pancreatitis aguda y la diabetes mellitus (Cotgreave, 1997; Ho et al., 1999; Kim et al., 2000). También, en un modelo murino de shock endotóxico generado tras la inyección de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, pudo comprobarse que la NAC reduce la activación del NF- κ B en macrófagos y linfocitos peritoneales (De la Fuente y Víctor, 2001; Víctor y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003b), evitando así el exceso de oxidación y modulando la función inmunitaria (Víctor et al., 2003a), efectos que se aprecian tanto *in vitro* como *in vivo* (Víctor et al., 1999; Víctor y De la Fuente, 2002).

Datos clínicos han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento con NAC en distintas patologías en las que el sistema inmunológico se encuentra implicado, como es el caso de la infección por VIH (Dröge y Breitkreutz, 2000), de cardiopatías (Gavish y Breslow, 1991) y de cánceres (Hecht et al., 2002).

La NAC es capaz de inhibir la apoptosis mediada por TNF- α en células mononucleares infectadas por VIH, acción que lleva a cabo a través de la disminución en

la activación del NF κ B (Malorni et al., 1993). En individuos con VIH, la NAC aumenta la formación de colonias de células T *in vitro* (Wu et al., 1989), provoca un alto grado de supresión del virus en linfocitos estimulados con citoquinas (Harakech y Jariwalla, 1991), y activa la capacidad citotóxica de los leucocitos (Roberts et al., 1995). Malorni et al. (1998) observaron que la NAC es capaz de inhibir la replicación viral y la apoptosis de células infectadas, puesto que permite el mantenimiento de la estructura de la membrana en estas células. Esos autores apuntaron, además, la posibilidad de utilizar el perfil redox de los pacientes para determinar el estado de la enfermedad puesto que los índices de peroxidación plasmática aumentan a medida que dicha enfermedad avanza. Así, una terapia combinada de fármacos antivirales y antioxidantes podría mejorar la calidad de vida de estos enfermos.

También, la presencia de NAC restableció la respuesta proliferativa, la actividad citotóxica NK y la producción de citoquinas por parte de células mononucleares humanas, disminuidas tras el tratamiento con LDL oxidadas (Viora et al., 2001). La NAC aumenta la proliferación de esplenocitos empleando niveles óptimos y subóptimos de concanavalina A y LPS (Omara et al., 1997), e inhibe la apoptosis de timocitos inducida por el exceso de radicales libres del oxígeno (McLaughlin et al., 1996). En general, puede decirse que estimula la función de las células T (Eylar et al., 1993).

Nuestro grupo ha comprobado que la NAC *in vitro* estimula también el proceso fagocítico de los macrófagos peritoneales murinos (Del Río et al., 1998). Además, la NAC disminuye la secreción de TNF- α , IL-6 e IL-8 en macrófagos alveolares humanos *in vitro* (Gosset et al., 1999). La NAC tiene efecto antiinflamatorio sobre macrófagos en cultivo, puesto que inhibe la producción de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP 1- α), que es activada por las ROS (Steinhauser et al., 1998). En neutrófilos, la NAC disminuye la producción de radical superóxido y favorece su capacidad fagocítica (Urban et al., 1997; Sadowska et al., 2006).

En relación a los efectos beneficiosos de la NAC incidiendo sobre la inmunosenescencia, se ha comprobado que su presencia *in vitro* estimula la actividad NK de células mononucleares procedentes de ganglios axilares, bazo, timo y leucocitos peritoneales de ratones viejos (Ferrández et al., 1999). También, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la suplementación con NAC mejora la función inmunológica y disminuye el estrés oxidativo en leucocitos de ratones viejos y con envejecimiento prematuro (Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2005a), siendo capaz, en su administración conjunta con otro

antioxidante de tipo tiólico, la tioprolina, de aumentar la esperanza de vida media en ambos (Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b).

La quimiotaxis de los linfocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos mejora tras la administración de NAC durante un periodo relativamente corto, aproximando sus valores a los encontrados en los individuos control (Puerto et al., 2002). De hecho, nuestro grupo ha comprobado que los linfocitos de ratones viejos a los que se les ha administrado antioxidantes tiólicos no muestran los pigmentos de lipofuscina presentes en los sujetos control (De la Fuente, 2008a; 2008b).

Nuestro grupo también ha demostrado que la ingestión de NAC durante un mes mejora el proceso fagocítico de los macrófagos peritoneales murinos procedentes de animales adultos prematuramente envejecidos (Puerto et al., 2002). Hauer et al. (2003) observaron una disminución en los niveles plasmáticos de TNF- α en ancianos tras un tratamiento con NAC, que vincularon además con una mejora en la función muscular.

Por otra parte, se ha comprobado que la NAC aumenta las actividades del complejo I y IV en mitocondrias sinápticas de ratones envejecidos (Martínez y Martínez, 1999; Martínez, 2000), lo que sugiere una acción directa de este antioxidante tiólico en la cadena respiratoria mitocondrial (Martínez et al., 1994; 1999). Este efecto ocasiona un aumento en disponibilidad de ATP, y por lo tanto, una protección para el mantenimiento de la capacidad bioenergética mitocondrial (Banaclocha, 2001). Así, la NAC tiene también un papel protector frente a las enfermedades neurodegenerativas (Banaclocha, 2001).

En este aspecto, existen numerosos estudios que sugieren que la suplementación con compuestos con capacidad antioxidante y/o antiinflamatoria pueden ser eficaces para prevenir o revertir los déficits en la conducta asociados al envejecimiento (Casadesus et al., 2002; Joseph et al., 2005a; Guayerbas et al., 2005b). La administración de vitamina E a ratones ha mostrado efectos beneficiosos sobre la función neuromuscular y la actividad exploratoria, el daño oxidativo a proteínas y lípidos en cerebro, y las actividades enzimáticas en mitocondrias de esa misma localización (Navarro et al., 2005). Diferentes autores han demostrado la eficacia de esta misma vitamina y de las suplementaciones a base de combinaciones de compuestos de tipo polifenólico así como de otros antioxidantes dietarios en revertir los deterioros en la función cognitiva y/o motora asociados con la edad (Joseph et al., 1998; 1999; Shukitt-Hale et al., 1999; 2003; Casadesus et al., 2004). Joseph et al. (2005b) afirman que los antioxidantes están implicados en múltiples y complejos mecanismos, incluyendo factores y receptores neurotróficos, y procesos de

neurogénesis en áreas cerebrales como el hipocampo. Todos estos datos sugieren que las suplementaciones con compuestos antioxidantes son capaces de aumentar la plasticidad y función neuronal en áreas cerebrales afectadas por el envejecimiento.

En este sentido, a pesar de que se ha apuntado que algunos déficits relacionados con la edad son muy difíciles de revertir si los tratamientos se inician a una edad tardía, como es el caso de los déficits motores (Shukitt-Hale et al., 1999), la administración crónica de GSH durante 6 meses en ratas viejas de 18 meses de edad fue capaz de mejorar la función motora de los animales. Además, el grupo tratado con este antioxidante presentó la mejor tasa de supervivencia (Shukitt-Hale et al., 1999).

Farr et al. (2003) encontraron que al administrar NAC de forma crónica a ratones SAMP8 de 12 meses, que mostraban una mayor oxidación en lípidos y proteínas cerebrales que los ratones de 4 meses, los animales veían mejorada su función cognitiva y disminuido el estrés oxidativo a nivel cerebral. En este sentido, es importante considerar que este antioxidante es capaz, además, de atravesar la barrera hematoencefálica.

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que la administración de antioxidantes tiólicos precursores del GSH, entre los que se encuentra la NAC, en dos períodos diferentes de la vida de ratones (adulta y vejez), protege del deterioro comportamental asociado a la edad, especialmente en los ratones prematuramente envejecidos (Guayerbas et al., 2005b). Esta población sufre un envejecimiento prematuro, manifestado por ansiedad crónica, actividad exploratoria y locomotora disminuida, coordinación neuromuscular deteriorada, menor respuesta adaptativa al estrés en diversas pruebas conductuales, alteraciones en los niveles de corticosterona circulantes tanto basales como en respuesta a estrés, deficiente sistema monoaminérgico en varias regiones cerebrales, y estrés y daño oxidativos aumentados en cerebro; deterioros neuroendocrinos que se suman al funcionamiento defectuoso de su sistema inmunitario, y al estrés y daño oxidativos intensificados en sus leucocitos y órganos linfocitarios (Viveros et al., 2001; 2007; Guayerbas et al., 2002a; 2002b; 2004; 2005a; 2005b; Puerto et al., 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente et al., 2003; Alvarado et al., 2005; 2006a; 2006b; Pérez-Álvarez et al., 2005; Álvarez et al., 2006; De la Fuente, 2008a; 2008b). Como ya se ha comentado, algunos de estos cambios inmunitarios, pero también conductuales, que tienen lugar de forma prematura con la edad están vinculados con una menor esperanza de vida de los animales prematuramente envejecidos (Guayerbas et al., 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003). Así, el deterioro inmunitario y conductual que padecen estos animales

mejora con la administración de NAC, lo que conduce a un aumento en su esperanza de vida (Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2004; 2005a; 2005b; De la Fuente, 2008a; 2008b). De este modo, la NAC podría incidir directamente sobre ambos sistemas, mejorando también su comunicación bidireccional, y por tanto, la homeostasis corporal y finalmente la salud.

1.2.2. El enriquecimiento ambiental.

El enriquecimiento ambiental (EA) supone una aproximación experimental en modelos animales al mantenimiento de una vida social, intelectual y física activa en humanos. Son muchos los estudios que han demostrado los beneficios del enriquecimiento ambiental a lo largo del envejecimiento revirtiendo el deterioro neurológico y cognitivo que se produce con la edad (Mattson et al., 2001; Segovia et al., 2006; 2009; Mora et al., 2007). El EA promueve una serie de efectos positivos como la neurogénesis hipocampal, incluso a edades avanzadas, mejora la respuesta de diversos neurotransmisores al estrés, la plasticidad molecular y funcional, así como disminuye el deterioro de neuronas, dendritas y sinapsis asociados a la edad (Segovia et al., 2006; Mora et al., 2007).

Cuando los animales, en etapas tempranas de la vida (jóvenes/adultos), se exponen durante semanas o meses a ambientes ricos en estimulación sensorial, el EA produce efectos conductuales y neurobiológicos profundos y duraderos; mejorando la actividad espontánea, aumentando la exploración, disminuyendo la emotividad y el miedo, y potenciando la habilidad de aprendizaje, a nivel de adquisición y de retención, de tareas condicionadas y no condicionadas en roedores, que varían desde el aprendizaje espacial y el reconocimiento de objetos, hasta la resolución de problemas. El EA induce efectos ansiolíticos, que son más pronunciados cuando las tareas o situaciones empleadas son altamente desafiantes para el individuo. Además, tales ambientes inducen efectos protectores frente a los déficits cognitivos y conductuales asociados a la edad, y así por ejemplo previenen del declive en el aprendizaje y la memoria (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Roy et al., 2001; Fernández-Teruel et al., 2002; Meshi et al., 2006).

Los animales enriquecidos se muestran comportamentalmente menos estresados que los no enriquecidos. Cuando los individuos se exponen a situaciones o tareas amenazantes, aquellos que han vivido en ambientes enriquecidos muestran una capacidad superior para adaptarse o enfrentarse a la situación, lo que se observa especialmente cuando

ésta es conflictiva o estresante y/o debe ser resuelta empleando estrategias complejas (Klein et al., 1994; Fernández-Teruel et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que en dichas situaciones los roedores enriquecidos muestran una menor respuesta de corticosterona que los no enriquecidos (Roy et al., 2001). También, los individuos que han tenido ambientes enriquecidos muestran mayor preferencia por la novedad, y se implican en actividades exploratorias más complejas que los no enriquecidos, habituándose más rápidamente a ambientes no familiares (Fernández-Teruel et al., 2002; Meshi et al., 2006).

No obstante, algunos autores han indicado resultados contradictorios acerca del efecto del EA a nivel conductual, que parece ser debida a que los animales que viven en estos ambientes muestran una organización comportamental diferente de los individuos control, más compleja y diversa (Renner y Rosenzweig, 1986; Renner, 1987; Widman y Rosellini, 1990).

A nivel cerebral, el enriquecimiento ambiental produce múltiples y variados efectos, entre los que se encuentran el aumento de la ya mencionada neurogénesis hipocampal del cerebro adulto y viejo (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000; Brown et al., 2003; Meshi et al., 2006; Segovia et al., 2006) y de la expresión de factores de crecimiento neurotróficos como el NGF (Mohammed et al., 1993; van Praag et al., 2000). Además, se ha observado una intensificación de la expresión del gen que codifica para el receptor 5-HT_{1A} en ese mismo área (Rasmuson et al., 1998), mayor expresión hipocampal del ARNm del receptor de glucocorticoides tipo II (Mohammed et al., 1993), mayores potenciales postsinápticos de excitación en el giro dentado (Foster et al., 2000), mayores potenciales de campo en el hipocampo (Sharp et al., 1985, 1987) y potenciación a largo plazo (Hargreaves et al., 1992). El EA también produce un aumento de la actividad de la proteína quinasa C hipocampal (Paylor et al., 1992) y de los niveles de actividad acetilcolinesterasa en regiones cerebrales corticales y subcorticales (Por et al., 1982), una mejora en las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA en el hipocampo alteradas con la edad, así como de los niveles de dopamina, acetilcolina, glutamato y GABA bajo condiciones de estrés agudo moderado en la corteza prefrontal (Mora et al., 2007). Otros efectos del EA son el aumento del contenido cerebral de ARN (Rosenzweig y Bennett, 1996) y los cambios en la expresión de un elevado número de genes, muchos de cuales se encuentran implicados en la estructura neuronal, la función sináptica y la plasticidad (Rampon et al., 2000). Respecto a los cambios morfológicos que se producen en hipocampo y corteza, se incluyen aumento de la sinaptogénesis y de la densidad sináptica, incremento de las ramificaciones y de las

espinas dendríticas, y cambios en el grosor, la proliferación glial y las dimensiones de núcleos y pericarios (Diamond, 1988; Rosenzweig y Bennett, 1996; van Praag et al., 2000).

Parecer ser que los efectos del enriquecimiento sobre los receptores de glucocorticoides son consecuencia de la reducción en las respuestas hormonales del eje HHA (Roy et al., 2001). Los animales enriquecidos podrían presentar un sistema HHA más adaptativo, dado que la elevada expresión de receptores para hormonas glucocorticoides en el hipocampo proporcionaría un mecanismo de retroalimentación negativa más eficaz. Esto a su vez haría a los animales enriquecidos más resistentes a los efectos de los factores estresantes y menos vulnerables a los procesos neurotóxicos deletéreos que potencian la exposición prolongada a altos niveles de glucocorticoides (Meaney et al., 1988, 1991; Mohammed et al., 1993; Roy et al., 2001), siendo éste un mecanismo clave en la protección del deterioro cerebral asociado a la edad (Fernández-Teruel et al., 2002).

También, algunos autores han sugerido que la mejora en estos parámetros puede estar mediada, al menos en parte, por una disminución en los niveles de estrés oxidativo cerebrales (Fernández et al., 2004).

Por tanto, los efectos beneficiosos a nivel neuroendocrino de la vida en un ambiente enriquecido son evidentes. El EA ejerce su acción directa sobre este sistema, pero dada la comunicación del mismo con el sistema inmunitario, este tipo de intervención podría también incidir de manera indirecta pero determinante sobre la funcionalidad inmunológica. A pesar de ello, los estudios que relacionan el ambiente enriquecido con la función inmunitaria de los individuos son muy escasos. Algunos autores ya han apuntado la existencia de una marcada mejoría de la actividad NK, junto con los menores niveles de ansiedad, en ratones machos expuestos a un periodo de 6 semanas de enriquecimiento ambiental (Benaroya-Milshtein et al., 2004). No obstante, por el momento no existen datos acerca del posible efecto de la vida en un ambiente enriquecido sobre toda una serie de parámetros inmunológicos que puedan ser marcadores de edad biológica, ni sobre la longevidad de los individuos.

Justificación y Objetivos

El proceso de envejecimiento se inicia como consecuencia de la oxidación en las mitocondrias de las células diferenciadas, siendo las neuronas su máximo exponente. Además, según la teoría oxidativa-inflamatoria del envejecimiento, las células inmunitarias son elementos clave en la tasa a la que este proceso se produce, pero por el momento, los mecanismos implicados no se conocen con exactitud. En este contexto, es de indudable interés el estudio de ambos sistemas reguladores, el nervioso y el inmunitario, en individuos que han alcanzado una longevidad próxima a la máxima de su especie. Cada vez son más las investigaciones científicas en torno a centenarios humanos, gracias a las que se han descrito una variedad de marcadores inmunológicos de salud y longevidad, cuya evolución en algunos casos es opuesta a la que se encuentra en presencia de enfermedades neurodegenerativas. No obstante, la mayoría de estudios en humanos centenarios se centran en uno o en unos pocos parámetros, perdiéndose el contexto de globalidad. De ahí la utilidad del empleo de animales de experimentación longevos, sobre los cuales, sin embargo, los estudios son prácticamente inexistentes. Por tanto, el primer gran objetivo de la presente tesis ha sido:

1. Caracterizar ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico.

Este objetivo se subdividió en los objetivos parciales que se indican a continuación:

1.1. Estudio de una amplia variedad de funciones así como de parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio, y de la activación del factor de transcripción NF κ B, en los leucocitos peritoneales a lo largo del envejecimiento, en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos, y longevos.

1.2. Estudio de los cambios morfológicos cerebrales a lo largo del envejecimiento, mediante imagen por resonancia magnética, en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos, y longevos.

1.3. Profundización en el daño oxidativo inmunitario y cerebral a proteínas, así como en la susceptibilidad a la oxidación lipídica y su relación con la composición en ácidos grasos, en ratones hembras BALB/c adultos, viejos, y longevos.

En base a la comunicación entre los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino, nuestro grupo de investigación ha podido comprobar, en estudios previos, que los ratones que muestran, de forma crónica, ansiedad y exceso de reactividad al estrés, sufren también una inmunosenescencia prematura en lo referente a diversas funciones de los leucocitos, así como un mayor estrés oxidativo, lo que da como resultado un envejecimiento fisiológico prematuro y una menor esperanza de vida que los de igual edad cronológica que no manifiestan esa inadecuada respuesta al estrés. La evolución de tales parámetros inmunitarios con la edad sigue un patrón similar en ratones y en humanos, por lo que nos preguntamos si alteraciones neuroendocrinas debidas a la ansiedad y a situaciones de estrés podrían conducir también, en humanos, al deterioro acelerado de dichos parámetros, lo que los confirmaría como modelos de envejecimiento prematuro. Por otra parte, el envejecimiento se acompaña de una pérdida de la capacidad de adaptación a situaciones estresantes, siendo el aislamiento social una condición frecuente en nuestros mayores, y especialmente en las mujeres, dada su mayor esperanza de vida media. Así, en la presente tesis nos planteamos el siguiente gran objetivo:

2 Caracterizar el efecto de alteraciones neuroendocrinas, en base a la presencia de estrés psicológico crónico, sobre parámetros inmunitarios marcadores de salud y longevidad.

Este objetivo fue subdividido en los objetivos parciales que se detallan a continuación:

21. Estudiar, en humanos, el efecto de la ansiedad crónica y de la situación de estrés psicosocial por carencia de hogar, sobre diversas funciones de los leucocitos de sangre periférica y en los niveles de antioxidantes.

22. Desarrollar un modelo animal de aislamiento social durante la vejez y estudiar su efecto sobre diversas funciones de linfocitos esplénicos y tímicos, así como sobre el contenido en glutatión de estas células, en ratones muy viejos C57BL/129Sv lemmings.

Por otra parte, la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento ha aumentado de manera dramática en paralelo al aumento de la esperanza de vida y del consecuente envejecimiento de las sociedades. Éste es el caso de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa y causa de demencia senil más frecuente. Los cambios en el sistema inmunitario periférico con el envejecimiento y en individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer apuntan hacia la posible contribución de una inmunosenescencia prematura en el desarrollo y/o curso de esta patología. No obstante, existe cierta controversia en los estudios realizados en humano, debidas en gran medida a la dificultad de rigor en los criterios de inclusión, mientras que la escasez de participantes en los estudios no ha posibilitado por el momento explorar las diferencias de género. En la actualidad, la ciencia dispone de valiosos modelos animales que permiten eludir estas limitaciones, entre los que destaca el modelo triple transgénico desarrollado en la Universidad Irvine de California. Estos animales albergan los transgenes *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} y *tau*_{P301L}, de modo que mimetizan la neuropatología del cerebro humano con Alzheimer, en las regiones relevantes de la enfermedad, y de manera dependiente de la edad. Por tanto, nos planteamos como otro gran objetivo de la presente tesis:

3. Caracterizar los cambios inmunitarios, a nivel de diversas funciones y del contenido en glutathione de linfocitos esplénicos y tímicos, así como la concentración de corticosterona plasmática, en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Las intervenciones al envejecimiento pueden estar dirigidas a la ralentización del proceso biológico, y/o a la disminución de las enfermedades asociadas con la edad, esto es, a la mejora de la salud y por tanto, de la calidad de vida. De este modo, la suplementación con cantidades apropiadas de antioxidantes es una estrategia potencialmente útil en el contexto de las teorías de los radicales libres y de la oxidación-inflamación del envejecimiento. Su efecto beneficioso para el sistema inmunitario, y concretamente para las funciones ya indicadas como parámetros de longevidad, ha sido comprobado por nuestro grupo de investigación en humanos, como es el caso de las vitaminas C y E, y en ratones, para una gran variedad de compuestos antioxidantes, especialmente de tipo tiólico y precursores del antioxidante más potente que presenta el organismo, el glutathione. La N-acetilcisteína es uno de los precursores más estables de glutathione, que además de revertir el

deterioro inmunitario asociado al envejecimiento, aumenta la esperanza de vida media en el ratón. Sin embargo, y a pesar del alto grado de seguridad de este antioxidante, que se dispensa en farmacias sin prescripción facultativa, no existen estudios sobre su efecto en el sistema inmunológico en humanos de edades avanzadas. Por tanto, en la presente tesis nos planteamos el siguiente gran objetivo:

4. Caracterización del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre diversas funciones de las células inmunitarias de sangre periférica, así como sobre el contenido en glutatión de esos leucocitos, y los niveles de malondialdehído, en mujeres postmenopáusicas.

Entre las posibles intervenciones en el proceso de envejecimiento, otra estrategia que ha cobrado gran importancia durante las últimas décadas es el estilo de vida, como factor determinante en la calidad de ésta. El enriquecimiento ambiental supone una aproximación experimental en modelos animales al mantenimiento de una vida social, intelectual y física activa en humanos. En este sentido, existen varios estudios que han demostrado una variedad de efectos beneficiosos del enriquecimiento ambiental sobre el deterioro nervioso que se produce con la edad y en patologías como la enfermedad de Alzheimer en roedores. No obstante, por el momento no se conoce apenas su efecto sobre la función inmunológica y se desconoce si influye también sobre la longevidad de los individuos. Por ello, nos preguntamos si la mejoría que el enriquecimiento ambiental produce a nivel del sistema nervioso, podría beneficiar a los sistemas inmunitario y endocrino en dichos animales. Por estas razones, nos planteamos como otro gran objetivo de la presente tesis:

5. Caracterizar el efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino a lo largo del envejecimiento cronológico y patológico en ratones.

Este objetivo fue parcelado en los dos subobjetivos que se detallan a continuación:

5.1. Caracterizar el efecto de un ambiente enriquecido sobre una amplia variedad de parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales; sobre el

comportamiento de los individuos en varias pruebas conductuales y su morfología cerebral, así como sobre la longevidad, en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y muy viejos.

5.2. Estudiar el efecto de un ambiente enriquecido sobre diversas funciones así como el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y sobre la concentración de corticosterona plasmática, en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Material y Métodos

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Material biológico.

3.1.1.1. Animales.

En los experimentos en que se emplearon animales de experimentación, éstos fueron siempre ratones (*Mus musculus*). Todos los experimentos realizados con ratones a lo largo de la presente tesis se hicieron siguiendo las directrices dictadas en el Real Decreto 1201/2005 del 21 de Octubre de 2005 (BOE nº 252) acerca de la protección de animales para uso experimental.

Se emplearon varias cepas de ratones (ver apartado 3.2.1.1. "Protocolos experimentales en ratones" para conocer con detalle características, sexos y edades). Los ratones ICR/CD1 y BALB/c fueron mantenidos en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid) en condiciones estándar de alimentación, con pienso (dieta A04 de PANLAB) y agua *ad libitum*, a una temperatura de 22±2 °C y fotoperiodo invertido (12 h luz : 12 h oscuridad, con cambio horario a las 8:00 h). El mantenimiento de estas condiciones fue comprobado diariamente. Por su parte, los ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, así como los pertenecientes a la cepa salvaje de la que proceden C57BL/129Sv, fueron mantenidos en el animalario del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, en condiciones similares a las especificadas, con excepción del fotoperiodo, que fue normal.

3.1.1.2. Humanos.

Ver apartado 3.2.2.1. sobre protocolos experimentales en humanos para conocer con detalle las características, sexos y edades de los individuos empleados en cada experimento realizado a lo largo de la presente tesis. En todos los protocolos experimentales realizados en humanos, los participantes recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito, antes del inicio de cualquier procedimiento relativo al estudio. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki.

3.1.1.3. Líneas celulares.

Como diana para valorar la actividad *Natural Killer* de los leucocitos peritoneales se utilizó la línea celular YAC-1, procedente de un linfoma murino de células T inducido por el virus de Moloney, mientras que para la valoración de esta misma función en linfocitos de sangre periférica humana se empleó la línea celular K562, línea mieloblástica procedente de eritroleucemia humana. Ambas fueron cedidas por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Madrid y mantenidas hasta su utilización a -80°C en condiciones de esterilidad y en alicutas de 2×10^6 células/ml de medio completo (RPMI 1640 con 1% gentamicina, 0,1 mg/ml, y suplementado con 10% suero fetal de terrera descomplementarizado) y 10% de DMSO, como agente crioprotector.

3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas.

3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura.

- Solución salina tamponada de fosfatos (PBS), conteniendo cloruro sódico (NaCl) 123,2 mM (PANREAC); fosfato disódico (Na_2HPO_4) 10,84 mM (PANREAC); fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 3,23 mM (BDH CHEMICALS) y agua destilada, pH 7,4.
- Solución salina balanceada de Hank, conteniendo D (+)-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 5,55 mM (PANREAC); cloruro magnésico (MgCl_2) 1 mM (PANREAC); cloruro sódico (NaCl) 136,89 mM (PANREAC); cloruro potásico (KCl) 5,36 mM (PANREAC); cloruro cálcico (CaCl_2) 1,26 mM (PANREAC); fosfato magnésico (MgHPO_4) 0,80 mM (PANREAC); fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0,44 mM (BDH CHEMICALS); fosfato disódico (Na_2HPO_4) 0,42 mM (PANREAC); bicarbonato sódico (NaHCO_3) 4,16 mM (PANREAC) y agua destilada, pH 7,4.

La esterilización de los medios se realizó en el caso del PBS en autoclave durante 1 h a 1 atmósfera de presión y 120°C , y para el Hank mediante filtración a través de una membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro (MILLIPORE). Los medios, una vez esterilizados, se almacenaron a 4°C .

- Tampón fosfato 50 mM, conteniendo fosfato disódico (Na_2HPO_4) (PANREAC) y fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (BDH CHEMICALS) en relación 1,5:1, pH 7.
- Tampón fosfato 50 mM, conteniendo fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (FLUKA) pH 6,8.

3.1.2.2. Medios comerciales.

- HEPES (1M) (INVITROGEN).
- RPMI 1640 con rojo fenol, HEPES (25 mM) y L-glutamina (20 mM) (PAA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL) (descomplementarizado mediante calentamiento en baño a 56°C durante 30 min y esterilizado por filtración) y 1% de gentamicina (0,1 mg/ml) (GIBCO BRL).

- RPMI 1640 con rojo fenol y sin L-glutamina (PAA).
- RPMI 1640 sin rojo fenol y con L-glutamina (PAA).

Estos medios fueron suministrados y mantenidos en condiciones de esterilidad a 4 °C.

- Tris-borato-EDTA (TBE, 10X) (INVITROGEN).

3.1.3. Reactivos y kits comerciales.

- Acetato de forbol miristato (PMA) (SIGMA), a una concentración inicial de 2 mg/ml de agua:DMSO (1:3) y conservado a -20 °C hasta su utilización.
- Ácido bórico (PANREAC).
- Ácido clorhídrico (HCl) (PANREAC).
- Ácido clorhídrico al 37% (SIGMA).
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA).
- Ácido etilendiaminetetracético (EDTA) (SIGMA).
- Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) (SIGMA).
- Ácido fítico (SIGMA).
- Ácido glioxílico (MERCK).
- Ácido ortofosfórico al 85% grado HPLC (H₃PO₄) (FLUKA).
- Ácido pícrico (PANREAC).
- Ácido 2'-tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA).
- Ácido tricloracético (TCA) (PANREAC y SIGMA).
- Ácido trifluoroacético (SIGMA).
- Agua para PCR (SIGMA).
- Agua tridestilada, desionizada y esterilizada en autoclave durante 1 h a 1 atmósfera de presión y 120°C.
- Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA).
- Alcohol metílico para HPLC (CARLO EBRA).
- [α -³²P]dCTP (9,25 MBq, 250 μ Ci) (AMERSHAM BIOSCIENCES).
- Anticuerpo anti- β actina (ABCAM).
- Anticuerpos monoclonales anti-CD8, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD11b (BD PHARMIGEN) y anti-CD11c (CALTAG LABORATORIES), conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, FL1), y anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (PE)-cianina (PC5, FL3) (BD PHARMIGEN).
- Anticuerpo monoclonal anti-CML (BIOLOGO), y anti-*mouse* conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (AMERSHAM).
- Anticuerpo monoclonal anti-MDAL conjugado con HRP (ACADEMY BIOMEDICAL COMPANY).
- Anticuerpos monoclonales anti-TLR2 y anti-TLR4 conjugados con PE (FL2) (BD PHARMIGEN).
- Aprotinina (SIGMA).
- Azida sódica (SIGMA).
- Azul tripán, solución al 0,4%, estéril (SIGMA).
- Azur-eosina-azul de metileno (PANREAC).
- β -mercaptoetanol (SIGMA).
- β -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (β -NADPH) (SIGMA).
- Bicarbonato sódico (NaHCO₃) (PANREAC).
- Butilhidroxitolueno (BHT) (SIGMA).

- Cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) (MERCK).
- Citrato sódico en tubos estériles (BD VACUTAINER SYSTEMS).
- Cloroformo (RIEDEL-DE HAËN).
- Cloruro cálcico (CaCl_2) (PANREAC).
- Cloruro de acetilo (FLUKA).
- Cloruro magnésico (MgCl_2) (PANREAC).
- Cloruro potásico (KCl) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCl) (PANREAC).
- Concanavalina A (ConA) (SIGMA) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS estéril y almacenada a -20°C .
- dCTP (INVITROGEN).
- DETAPAC (SIGMA).
- Detergente NP-40 (solución al 10%) (FLUKA).
- Diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Sonda fluorescente, $\text{H}_2\text{DCF-DA}$) (MOLECULAR PROBES), a una concentración inicial de 10 mM en PBS estéril, y conservado a -20°C hasta su uso.
- Diclorometano (SIGMA).
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) (SIGMA).
- Dioxano (MERCK).
- Disulfuro de carbono (CS_2) (SIGMA).
- Ditioneitol (SIGMA).
- Ditioneitol (DTT) (SIGMA).
- ELISA para valorar niveles de IL-2 en humano (DIACLONE).
- ELISA para valorar niveles de IL-2 en ratón (R&D SYSTEMS).
- ELISA para valorar niveles de IL-8 en humano (DIACLONE).
- ELISA para valorar niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en humano (DIACLONE).
- ELISA para valorar niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en ratón (HYCULT BIOTECHNOLOGY).
- Estándares de ácidos grasos con tiempo de retención conocido (SIGMA).
- Estándares internos no deuterados (SIGMA).
- Estándares preteñidos de peso molecular conocido para seguimiento de electroforesis (BIORAD).
- Etanol (MERCK).
- Fenilmetilsulfonil-floruro (PMSF) (SIGMA).
- Fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA). Se prepara una solución de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración en PBS, se alícuota y conserva a -20°C hasta su uso.
- Flumil® (ZAMBON).
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (PANREAC).
- Fosfato magnésico (MgHPO_4) (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (BDH CHEMICALS).
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) para HPLC (FLUKA).
- Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el correspondiente tampón Klenow (INVITROGEN).
- Gentamicina (GIBCO BRL).
- Glicerol (SIGMA).
- D (+)-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (PANREAC).
- Glutation reducido (GSH) (SIGMA).
- Glutation reductasa (GR) (SIGMA).
- Hexanol (FLUKA).
- Hidroperóxido de cumeno (SIGMA).

- Hidróxido de potasio (KOH) (MERCK).
- Histopaque de densidad 1,077 g/ml (SIGMA DIAGNOSTICS). Medio separador de las células sanguíneas que se presenta en botellas de 100 ml y se conserva a 2-8 °C en oscuridad.
- Histopaque de densidad 1,119 g/ml (SIGMA DIAGNOSTICS). De características similares al anterior.
- JC-1 (Sonda fluorescente) (MOLECULAR PROBES), a una concentración de 1 mg/ml en DMSO y almacenado a -20 °C.
- Kit colorimétrico para valorar actividad citotóxica (PROMEGA).
- Kit colorimétrico para valorar la capacidad antioxidante total (DELTA CLON).
- Kit colorimétrico para valorar cortisol (BIOLINK).
- Kit colorimétrico para valorar contenido proteico a través del ácido bicinonínico (BCA) (SIGMA).
- Kit fluorométrico para valorar actividad xantina oxidasa (MOLECULAR PROBES).
- Lipopolisacárido (LPS) (SIGMA) de *E. coli* (055:B5), alícuotado a 100 µg/ml en PBS estéril y almacenado a -20 °C.
- Líquido de centelleo (PANREAC).
- Líquido de Turk (PANREAC).
- d8-lisina (MSD ISOTOPES).
- Malondihaldehído (MDA) (SIGMA).
- Metanol (MERCK).
- Metanol grado HPLC (MERCK).
- Mezcla de dATP, dTTP y dGTP (INVITROGEN).
- N-butanol (PANREAC).
- N-etil-maleimida (NEM) (SIGMA).
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) (SIGMA). Puesto que se presenta liofilizado, se reconstruye con solución de Hank en el momento de su utilización para obtener una concentración de 1 mg/ml. Se conserva a 4 °C protegiéndolo de la luz.
- Nitrógeno líquido (FACULTAD CC QUÍMICAS, UCM).
- Nitrógeno gas para evaporar (AIR LIQUID).
- N-pentano (98 %) (SIGMA).
- N-Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-trifluorometilcumarina (Suc-LLVY) (SIGMA).
- Oligodeoxinucleótidos de cadena sencilla sentido y antisentido, correspondientes a la región palindrómica α B (5'-GGGAATTC-3') (INVITROGEN).
- Partículas de látex, de $1,091 \pm 0,0082$ µm de diámetro (SIGMA), diluidas al 1% en PBS estéril y conservadas a 4 °C hasta su uso.
- Pepstatina (AMERSHAM).
- Péptido formilado (f-Met-Leu-Phe: fMLP) de *E. coli* (SIGMA), reconstituido en PBS (10^{-2} M), alícuotado y conservado a -20 °C hasta su utilización.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂, solución al 35%) (MERCK).
- Persulfato de amonio (SIGMA).
- Poliacrilamida:bisacrilamida (30:1) (SIGMA).
- Poli(dI-dC) de doble cadena (AMERSHAM BIOSCIENCES).
- RIA para valorar niveles de Corticosterona (SIEMENS).
- Sistema de detección de 21 citoquinas de ratón mediante MULTIPLEX (UPSTATE).
- Sucrosa (PANREAC).
- Suero fetal bovino (GIBCO BRL).
- Sustrato quimioluminiscente de la HRP (MILLIPORE).
- TEMED (SIGMA).
- Tetraborato de sodio (NaBH₄) (SIGMA).

- Timidina tritiada (ICN) con una actividad específica de 35 Ci/mmol, diluída a 0,1m Ci/ml en PBS estéril y almacenada a 4° C.
- Tinción de plata (INVITROGEN).
- Tritón X-100 (SIGMA).
- Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-metilcumarina (Z-LLE) (SIGMA).
- Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) (SIGMA).

3.14. Material de laboratorio.

- Agujas.
- Cámaras de Boyden, utilizadas en las pruebas de quimiotaxis. Fabricadas de metacrilato, presentan dos compartimentos de 13 mm de diámetro externo, 9 mm de diámetro interno y 5 mm de altura cada uno.
- Columna capilar SP2330 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm).
- Columna capilar 30 m HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).
- Columnas de adherencia; preparada en pipeta Pasteur, en la que se empaquetan 50 mg de lana de nylon con una altura de 1,25 cm.
- Columna de extracción en fase sólida C-18 de 1 ml (SUPELCO).
- Columna de intercambio iónico (DOWEX-50W).
- Columnas de sefadex G25 (AMERSHAM BIOSCIENCES).
- Columna Novapack C18 (15 cm x 3,9 mm) (WATERS).
- Contador de células manual (REXEL).
- Cronómetros.
- Cubetas de vidrio óptico y de cuarzo de 1 cm de paso óptico (STARNA).
- Enriquecimiento ambiental (LILLICO).
- Filtros (MILLIPORE) de 25 mm de diámetro y 0,22 µm de poro, para la esterilización de medios.
- Filtros (MILLIPORE) de nitrocelulosa transparentables de 13 mm de diámetro y 3 µm de poro, para las pruebas de quimiotaxis.
- *Flask* de cultivo (IWAKI GLASS).
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).
- Jeringa HAMILTON.
- Lana de nylon (DU PONT).
- Material de electroforesis en una y dos dimensiones (2D PAGE), y de transferencia: cubetas, etc. (Mini-Protean Tetra Cell y Criterion, BIORAD).
- Material de disección: tijeras, pinzas, etc.
- Material de plástico: jeringuillas desechables, tubos, eppendorfs, guantes, puntas de pipetas automáticas, parafilm, etc.
- Material de vidrio: tubos, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, placas Petri, probetas, vasos de precipitados, termómetros, etc.
- Membrana de transferencia (MILLIPORE).
- Papel de filtro (ALBET) para la recolección de células.
- Papel WHATMAN para electrotransferencia de gel.
- Pipetas automáticas y multidispensadoras (GILSON y BOECO).
- Placas M.I.F. (KARTELL) de 8 pocillos (1,5 cm de diámetro) para el ensayo de fagocitosis.
- Placas de 96 pocillos: de fondo plano transparentes (NUNC), de fondo plano negras (COSTAR), y de fondo en U transparentes (NUNC).

La esterilización de material se efectúa en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora. Para el material que no puede ser sometido a autoclave (pipetas automáticas, columnas de adherencia, etc.), se emplea luz ultravioleta durante 20 minutos antes de la utilización del mismo.

3.1.5. Aparataje.

- Agitadores de tubos y de placas (BUNSEN).
- Autoclave (SELECTA).
- Balanzas de precisión (SAUTER y SARTORIUS).
- Balas de CO₂ y de helio (PRAXAIR).
- Baño con sonicación (UPSTATE).
- Baño termostatzado con agitación (PRECISION SCIENTIFIC).
- Biospec 47/40 (BRUKER).
- Bloque térmico (SELECTA).
- Bomba de filtración (MILLIPORE).
- Cabinas de flujo laminar (TELSTAR AV-100, TELSTAR MICRO-H).
- Campo abierto (TALLER FACULTAD CC FÍSICAS, UCM).
- Centrífuga omnífuga refrigerada (2.0 RS HERAEUS).
- Centrífuga 32R (HETTICH ZENTRIFUGEN).
- Centrífuga modelo 5702R (EPPENDORF).
- Centrífuga SPD121P (THERMO ELECTRON CORPORATION).
- Citómetro de flujo (FACSCAN, BECKTON DICKINSON).
- Congeladores de -20°C (LIEBHERR) y de -80° C (HERAEUS).
- Contador β automático (PERKIN-ELMER).
- Contador γ automático (PERKIN-ELMER).
- Cromatógrafo de gases 7890A AGILENT TECHNOLOGIES.
- Cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD 6890 Serie II.
- Destilador de agua (MILLIPORE).
- Destilador de agua ultrapura (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).
- Equipo de análisis de imágenes ChemiDoc (BIORAD).
- Espectrofotómetro (ESPECTRONICS GENESIS 5).
- Espectrofotómetro y Fluorímetro de placas (TECAN).
- Espectrómetro de masas HEWLETT-PACKARD 5973A.
- Evaporador N-evap Model 113 (ORGANOMATION)
- Frigoríficos (FAGOR y LIEBHERR).
- Fuente de alimentación para electroforesis (BIORAD).
- Homogeneizador mecánico (WHEATON INSTRUMENTS).
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 5 y 2 ml (POBEL).
- Homogeneizador vidrio-vidrio de 60 ml (ALAMO).
- HPLC 2010 ALLIANCE con bomba isocrática LC625 SYSTEM y detector UV WATERS 486.
- HPLC en un sistema HEWLETT-PACKARD Serie 110.
- Incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ regulable (KOWELL y HERAEUS).
- Laberinto en cruz elevado (PANLAB).
- Luminómetro (LUMINEX 100™, UPSTATE).

- Microfuga refrigerada (BIOFUGE PICO, HERAEUS).
- Microscopio invertido (PLEUGER).
- Microscopios ópticos de contraste de fase (NIKON).
- pH-metro con electrodo (CRISON) y micropH-metro (HANNA INSTRUMENTS) con minitrodo (HAMILTON).
- PhosphorImager (BIORAD).
- Piscina Porsolt (TALLER FACULTAD CC FÍSICAS, UCM).
- Recolector de células (SKATRON).
- Sistema de filtración de placas (MILLIPORE).
- Sistema de vacío universal UVS400A (THERMO ELECTRON CORPORATION).
- Sonicador (BANDELIN SONOPULS).
- Tablero de agujeros (TALLER FACULTAD CC FÍSICAS, UCM).
- Vibrador de brazo oscilante (VIBROMATIC 348, SELECTA).
- Vórtex (PACISA).

3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Animales de experimentación: ratones.

3.2.1.1. Protocolos experimentales en ratones.

3.2.1.1.1. Caracterización de ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico.

Para los estudios en longevos utilizamos hembras ex-reproductoras de las cepas y edades que a continuación se detallan:

1) Ratones ICR/CD1 (HARLAM INTERFAUNA IBÉRICA) adultos maduros (44 ± 4 semanas), viejos (69 ± 4), muy viejos (92 ± 4) y longevos (125 ± 4). Los animales fueron marcados con ácido pícrico para su seguimiento individualizado y se mantuvieron en grupos de máximo 7 individuos. El número inicial de sujetos por grupo varió entre 7 y 14 individuos. Las muestras que se tomaron fueron leucocitos peritoneales, sin sacrificar a los animales. Los ensayos se realizaron con las muestras frescas, lo que posibilitó estudios de funcionalidad celular. Así, además de las principales subpoblaciones de leucocitos peritoneales, se estudió la capacidad quimiotáctica de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis de macrófagos, los niveles de ROS intraleucocitarios, la linfoproliferación basal y en presencia de los estímulos concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS), y la actividad NK. También se analizaron los niveles de una variedad de citoquinas pro- y anti-

inflamatorias, factores de crecimiento y quimioquinas en los sobrenadantes de los cultivos citados. Además, como marcadores de oxidación, se valoraron los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y se determinó la actividad de la xantina oxidasa (XO) en los leucocitos. Las defensas antioxidantes intraleucocitarias se estudiaron en base a los niveles de glutatión reducido (GSH), y a las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). También, analizamos la activación del NF- κ B en el núcleo de los leucocitos, la expresión en membrana de receptores Toll (TLR) 2 y 4 en las principales subpoblaciones de células peritoneales, y la apoptosis. Los animales se usaron posteriormente en los estudios de Imagen por Resonancia Magnética para valorar los cambios morfológicos cerebrales. Se anotó la fecha de muerte natural de cada sujeto.

2) Ratones BALB/c (HARLAM INTERFAUNA IBÉRICA) adultos (28 ± 4 semanas), viejos (76 ± 4) y longevos (128 ± 4). Los animales se mantuvieron en grupos de un máximo de 7 individuos. El número de individuos por grupo experimental varió entre 6 y 11. Las muestras empleadas fueron cerebro y bazo. Adicionalmente, se realizaron medidas en ganglios axilares, corazón, pulmón, riñón, hígado y leucocitos peritoneales. Estas muestras fueron congeladas a -80°C para la posterior realización de los ensayos, que consistieron en la valoración del daño oxidativo a proteínas, mediante el estudio de los marcadores malondialdehído-lisina (MDAL), carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), semialdehído glutámico (GSA) y semialdehído aminodípico (AASA), así como de las actividades quimiotripsina y caspasa del proteasoma 20S. También se analizó la composición en ácidos grasos procedentes de los lípidos totales.

3.2.1.1.2. Efecto del aislamiento social sobre diversas funciones de linfocitos esplénicos y tímicos, así como sobre el contenido en glutatión de esas células durante la vejez en ratones hembras.

El desarrollo del modelo animal de soledad en la vejez, que intenta reproducir la viudedad y el aislamiento social que con la edad experimentan muchas personas, especialmente mujeres, se llevó a cabo por la Dra. Lydia Giménez-Llort en el Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, un grupo de 20 ratones hembras no reproductoras de la cepa C57BL/129Sv estabuladas en grupos de 4-5 animales hasta su

vejez (72 semanas), siguieron en grupo (controles, n=10) o fueron aisladas a partir de ese momento y hasta alcanzar las 96 semanas de edad (aisladas, n=10). Los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de bazo y timo, que nos fueron cedidas, y se procesaron en fresco, para posibilitar los estudios funcionales. De dichos órganos se obtuvieron los linfocitos, en los que se analizó la quimiotaxis, la proliferación basal y en respuesta a ConA y LPS, y la actividad NK. También se valoraron los niveles de IL-2, inducidos por ConA, y los de TNF- α , en respuesta a LPS, en los sobrenadantes de dichos cultivos. Además, se determinaron los niveles de GSH intralinfocitarios, y se obtuvo el plasma, en el que se determinaron los niveles de corticosterona.

3.2.1.1.3. Estudio de los cambios inmunoendocrinos en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Para el estudio de las alteraciones inmunitarias sistémicas y las endocrinas (niveles de corticosterona) en individuos con la enfermedad de Alzheimer (AD), se escogió el modelo de ratón triple transgénico (3xTgAD) desarrollado en la Universidad Irvine de California por el equipo del Profesor F.M. LaFerla. Estos animales albergan los transgenes *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} y *tau*_{P301L}, de manera que mimetizan la neuropatología del cerebro humano con Alzheimer, en las regiones relevantes de la enfermedad, y de manera dependiente de la edad. Los animales que se emplearon fueron hembras y machos 3xTgAD viejos (60 semanas de edad). De la cepa de ratón salvaje C57BL/129Sv (NTg), de la que se obtuvo el 3xTgAD, se utilizaron ratones hembras y machos adultos (24 semanas) y viejos (60 semanas). Todos los animales eran vírgenes, y fueron mantenidos en grupos de 4-5. El número final de individuos utilizados por grupo varió entre 6 y 14. Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de bazo y timo, que nos fueron cedidas por la Dra. Lydia Giménez-Llort, y se procesaron en fresco. Los parámetros funcionales analizados en este estudio, en los linfocitos esplénicos y tímicos, fueron la quimiotaxis, la proliferación basal e inducida por ConA y LPS, y la actividad NK. También se estudiaron los niveles de IL-2 (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos inducidos por ConA), y de TNF- α (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados con LPS). Además, se valoraron los niveles de GSH intralinfocitarios, así como los niveles plasmáticos de corticosterona.

3.2.1.1.4. Efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario y nervioso a lo largo del envejecimiento cronológico.

Se estudiaron las muestras de leucocitos peritoneales de ratones hembras ex-reproductoras ICR/CD1 (HARLAM INTERFAUNA IBÉRICA) adultos maduros (44 ± 4 semanas), viejos (69 ± 4), y muy viejos (92 ± 4) enriquecidos y no enriquecidos (control). Los animales, que fueron marcados con ácido pícrico para su seguimiento individualizado, se mantuvieron en grupos de máximo 7 individuos. El número inicial de sujetos por grupo varió entre 7 y 14 individuos. El enriquecimiento consistió en la introducción en el interior de las jaulas de diversos objetos de distintas formas y colores, que fueron intercambiados cada 2 días. Entre ellos se incluyó además una casa de ratón, que fue mantenida permanentemente (Fig. 7A). En el momento de los intercambios de objetos, los animales del grupo control fueron sólo manipulados.

De manera previa al estudio inmunológico, se determinó el efecto del ambiente enriquecido (5-8 semanas) sobre varias pruebas conductuales (tablero de agujeros, campo abierto, laberinto elevado en cruz y natación forzada).

El análisis inmunitario se realizó con los leucocitos peritoneales frescos, lo que permitió estudios de funcionalidad celular. Esta toma de muestra se prolongó 2 meses, de modo que, hasta el momento de la adquisición de los leucocitos peritoneales, los animales enriquecidos de cada grupo de edad habían vivido en el ambiente enriquecido un mínimo de 8 semanas y un máximo de 16. Se estudiaron las principales subpoblaciones de leucocitos peritoneales, la capacidad quimiotáctica de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis de macrófagos, los niveles de ROS intraleucocitarios, la linfoproliferación basal y en presencia de ConA y LPS, y la actividad NK. También se estudiaron los niveles de IL-2 (en sobrenadantes de cultivo inducidos por ConA), y de TNF- α (en sobrenadantes de cultivo estimulados con LPS). Como marcadores de oxidación, se valoraron los niveles de GSSG y se determinó la actividad de la XO en el interior de los leucocitos. Las defensas antioxidantes intraleucocitarias se estudiaron en base a los niveles de GSH, y a las actividades de las enzimas GPx y CAT. Además, analizamos la expresión de TLR-2 y TLR-4 en las subpoblaciones de células peritoneales mayoritarias, así como la apoptosis.

Una vez finalizado el estudio inmunológico, los animales se sometieron a estudios de Imagen por Resonancia Magnética, de modo que los individuos enriquecidos habían disfrutado en ese momento de 16-18 semanas de enriquecimiento.

El ambiente enriquecido fue mantenido hasta la muerte natural de los animales de este grupo de enriquecimiento, la cual fue anotada para los estudios de longevidad. También se anotó la fecha de muerte natural de los animales del grupo control.



Figura 7. Enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad (A) y en el modelo 3xTgAD (B). El iglú en (A) y éste y la rueda de ratón en (B) fueron mantenidos de manera permanente, mientras que los otros objetos se intercambiaban cada dos días.

3.2.1.1.5. Efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario y endocrino en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Los animales que se emplearon fueron hembras y machos 3xTgAD y NTg viejos (60 semanas de edad) enriquecidos y no enriquecidos. Todos los animales eran vírgenes, y fueron mantenidos en grupos de 4-5. El número final de individuos utilizados por grupo varió entre 6 y 12. Los animales fueron sacrificados a la edad indicada y se obtuvieron muestras de bazo y timo, que nos fueron cedidas por la Dra. Lydia Giménez-Llort y se procesaron en fresco, para posibilitar los estudios funcionales. Se analizó la quimiotaxis, la proliferación basal e inducida por ConA y LPS, y la actividad NK de linfocitos esplénicos y

tímicos. También se estudiaron los niveles de IL-2 (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos inducidos por ConA), y de TNF- α (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados con LPS). Además, se valoró el contenido intralinfocitario en GSH, y se obtuvo el plasma para la determinación de los niveles de corticosterona.

En este caso, el enriquecimiento ambiental comenzó en la etapa adulta (24 semanas de edad) y se prolongó 5 meses y medio, esto es, durante 22 semanas, hasta la edad de 46 semanas. De igual modo, el enriquecimiento consistió en diversos objetos de colores y texturas variados, que se intercambiaron cada 2 días. En el momento de intercambio de esos objetos, los animales del grupo control eran manipulados. Se incluyó, además de un iglú permanente, una rueda para roedores (Fig. 7B).

3.2.1.2. Métodos experimentales en ratones.

3.2.1.2.1. Estudio conductual.

Se realizó una batería de pruebas destinadas a valorar parámetros comportamentales tales como actividad motora, actividad exploratoria, emotividad y ansiedad. Antes de iniciarse éstas, los animales fueron identificados mediante marcaje con ácido pícrico para su seguimiento individual. Las pruebas elegidas fueron: tablero con agujeros, campo abierto, laberinto en cruz elevado y test de Porsolt o de natación forzada; a las que los animales fueron sometidos en el orden mencionado (Fig. 8), siempre de 8.00 a 14.00 h (fase de oscuridad). Se dejó un intervalo de 3 días entre pruebas consecutivas para permitir la completa recuperación de los animales (De Cabo et al., 1995; Pérez-Álvarez et al., 2005). El test de Porsolt tiene un protocolo distinto al utilizado en el ensayo de analgesia inducida por estrés, como se expone más adelante.

Tablero de agujeros

El tablero con agujeros (Fig. 8A) es un instrumento consistente en un prisma cuadrangular, descubierto, con unas dimensiones de 45 cm de altura y base cuadrada de 60 cm de lado. Tanto las paredes como el suelo del tablero están pintadas de color negro mate, estando además la base dividida en 36 cuadrados de 10 cm de lado cada uno de ellos y delimitados por líneas de color blanco. En la zona central se encuentran 4 agujeros

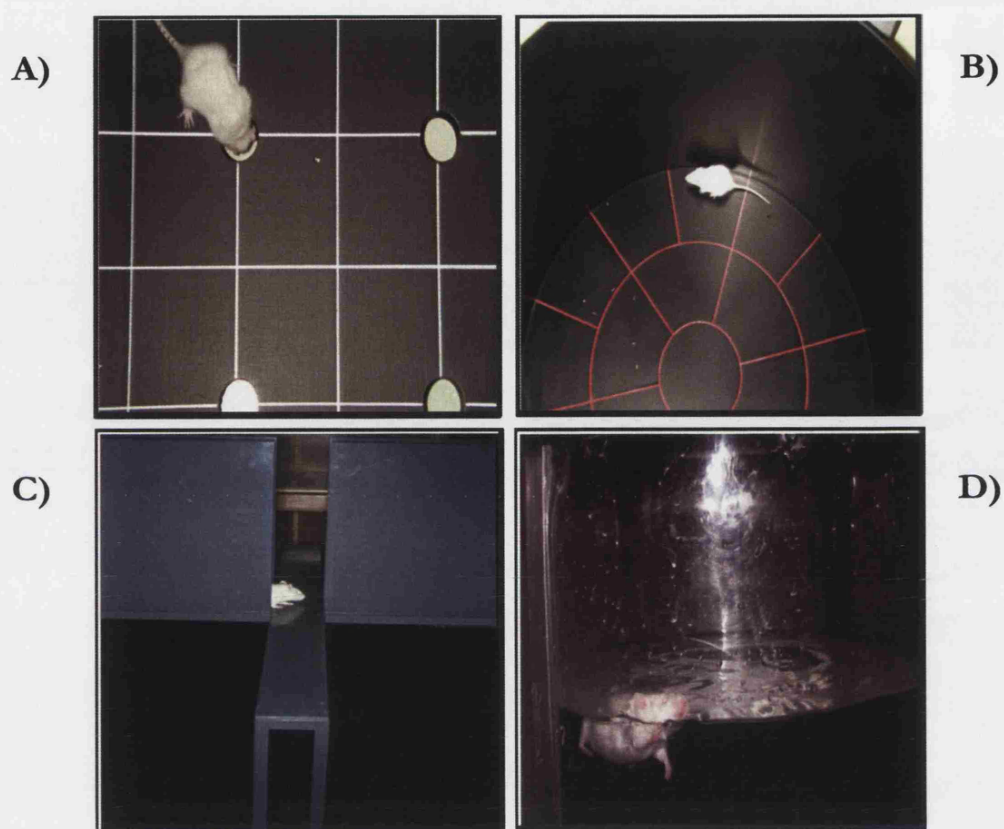


Figura 8. Batería de pruebas comportamentales en el orden empleado: tablero con agujeros (A), campo abierto (B), laberinto en cruz elevado (C) y test de Porsolt (D).

equidistantes, de 3,8 cm de diámetro, situados de manera que dibujen una zona central formada por 4 cuadrados.

La prueba comienza colocando al animal en un cuadrante externo. Se realizó en luz roja. Durante los 5 minutos de duración de la misma se registraron los siguientes parámetros:

Deambulación externa: Representa el número de cuadrantes adyacentes a la pared del recinto recorridos por el animal, considerando que éste cruza un cuadrante cuando introduce en él sus 4 patas. Esta medida es una muestra de la actividad motora horizontal del animal. Los resultados se expresaron como número absoluto de cuadrantes.

Deambulación interna: Representa el número de cuadrantes que el animal cruza en la zona interna del recinto, considerando que el animal está dentro del cuadrante cuando ha introducido 3 patas. Los ratones presentan tigmotaxia (tendencia a

desplazarse en contacto con una pared), por lo que la tasa de deambulación interna está inversamente relacionada con el nivel de emotividad de los animales. Además, se anotó la deambulación central por la zona más interna del recinto. Ambas se expresaron como número absoluto y como % de la deambulación total.

Deambulación total: Se obtiene como resultado de sumar la deambulación externa y la interna.

Tasa de postura erguida: Representa actividad vertical. Se considera que el animal presenta postura erguida cuando se apoya únicamente sobre las patas traseras y el cuerpo se eleva al menos 90° con respecto al suelo. Se expresó en número.

Frecuencia de exploración de agujeros: Se define como el número de veces que el animal introduce el hocico o la cabeza en el interior de algún agujero para explorarlo. Se ha sugerido que este parámetro representa la exploración inquisitiva del animal (Robbins, 1977).

Tiempo de exploración de agujeros: Se define como el tiempo en segundos que el animal invierte explorando agujeros. Este parámetro es un reflejo de la exploración inspectiva del animal (Robbins, 1977).

Defecaciones: Representa una medida de neofobia (Walsh y Cummins, 1976). Los resultados se expresaron en número.

Conductas de acicalamiento: Se relacionan con los niveles de ansiedad (File et al., 1988). Se anotó el número de este tipo de conductas realizadas por el animal a lo largo de la prueba.

La deambulación externa, por la periferia del recinto, es considerada como un parámetro general de locomoción. Por otra parte, la postura erguida es frecuentemente considerada como un parámetro con valor exploratorio en diversas observaciones comportamentales. Sin embargo, en esta prueba, la postura erguida se considera como un parámetro de actividad general o, en todo caso, de exploración inespecífica, en contraposición a la exploración dirigida, representada por la frecuencia y el tiempo de exploración de los agujeros, que son estímulos para el animal (File, 1992; De Cabo et al., 1995). De esta forma, esta prueba nos permite obtener medidas independientes de la actividad motora (deambulación externa y postura erguida) y de la exploración dirigida a estímulo (frecuencia y duración de exploración de agujeros) (File, 1992).

Campo abierto

El campo abierto (Fig. 8B) consiste en un cilindro de 76 cm de diámetro y 50 cm de altura, con paredes y suelo de color negro mate. El suelo se encuentra dividido en dos círculos concéntricos de 17 cm y 45 cm de diámetro cada uno de ellos, a su vez parcelados en un total de 19 sectores delimitados por rayas rojas mate.

La prueba comienza colocando al animal en un sector externo. Este test fue llevado a cabo en un ambiente iluminado con luz blanca. Durante los 3 minutos de duración de la prueba se registró: deambulación externa, interna y total; tasa de postura erguida; defecaciones; conductas de acicalamiento. Todos estos parámetros se valoraron de manera idéntica a la definida para el tablero de agujeros y tienen una interpretación similar a la previamente descrita, a excepción de la postura erguida, que en el campo abierto tiene un carácter exploratorio. Adicionalmente, se registró el tiempo de inmovilidad, que indica estado de emotividad, fundamentalmente relacionado con miedo y ansiedad, en segundos (De Cabo et al., 1995).

Laberinto elevado en cruz

El laberinto en cruz elevado (Fig. 8C) es un aparato que está formado por dos brazos abiertos de 50 cm de longitud y 10 cm de ancho enfrentados, y por dos brazos cerrados, con paredes de 40 cm de altura, también enfrentados y con las mismas dimensiones que los abiertos, en posición perpendicular a éstos últimos. La confluencia de los cuatro brazos da lugar a un cuadrado central de 10 cm de lado. Está construido en material plástico rígido de color azul mate, el suelo pintado de color negro mate, encontrándose además elevado 62 cm del suelo por un soporte metálico que consta de ocho patas.

Esta prueba, que valora la ansiedad del animal, se basa en la aversión que experimentan los roedores a la altura y a los espacios abiertos. Se escogió una duración de la prueba de 5 minutos (De Cabo et al., 1995), dado que el comportamiento de aversión es particularmente marcado durante ese tiempo comenzando a disminuir tras un período de 10 minutos (Montgomery, 1958). Se realizó en luz roja.

La prueba comienza situando el animal en la zona central neutra del aparato mirando hacia un brazo cerrado. Se considera que el animal está en uno de los brazos cuando mantiene sus cuatro patas dentro de él y que sale del brazo cuando saca, al menos, una de las patas (Pellow et al., 1985).

En esta prueba se registraron los siguientes parámetros:

Número de entradas a los brazos abiertos: Número de veces que el animal entra en cualquiera de los dos brazos abiertos.

Tiempo en brazos abiertos: Tiempo que el animal permanece en brazos abiertos.

Número de entradas a brazos cerrados: Número de veces que el animal entra en cualquiera de los dos brazos cerrados.

Tiempo en brazos cerrados: Tiempo que el animal permanece en brazos cerrados.

Tiempo en central: Tiempo que el animal permanece en la zona central de intersección entre brazos.

Adicionalmente se calcularon las siguientes variables:

Número de entradas totales: Número de veces que el animal entra en alguno de los brazos.

Porcentaje de entradas a los brazos abiertos: Representa el número de entradas en los brazos abiertos frente al número total de entradas realizadas en cualquier tipo de brazo.

Porcentaje de entradas a los brazos cerrados: Representa el número de entradas en los brazos cerrados frente al número total de entradas realizadas en cualquier tipo de brazo.

Tiempo total en los brazos: Tiempo en segundos que el animal ha pasado explorando cualquiera de los brazos.

Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos: Representa el tiempo pasado en los brazos abiertos frente al tiempo total empleado explorando cualquier tipo de brazo.

Porcentaje de tiempo en los brazos cerrados: Representa el tiempo pasado en los brazos cerrados frente al tiempo total empleado explorando cualquier tipo de brazo.

Se ha visto que el porcentaje de tiempo empleado en la exploración de brazos abiertos es el parámetro que mejor estima los niveles de ansiedad del animal, mientras que el número de entradas en brazos cerrados representa una estimación de la actividad motora general del animal (Pellow et al., 1985; File, 1992).

Test de Porsolt o de natación forzada

Cuando los ratones son obligados a nadar en un espacio reducido, rápidamente dejan de realizar movimientos de escape y se quedan inmóviles. Dicha inmovilidad se ve reducida cuando al animal se le administran fármacos de acción antidepresiva (Porsolt et al.,

1977). Por lo tanto, mediante la realización de esta prueba puede valorarse el fenotipo más o menos depresivo de los animales (Shearman et al., 2003; Cryan y Mombereau, 2004).

El modelo de natación forzada (Fig. 8D) consiste en introducir al animal en el interior de una piscina (en este caso cilíndrica, de metacrilato, con dimensiones de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura, con agua hasta los 30 cm) con agua mantenida a una temperatura constante de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, y registrar el tiempo de latencia a la primera flotación, el tiempo de inmovilidad que presenta el animal, el tiempo de natación y el tiempo que dedica el animal a conductas de escape o *climbing*. El tiempo de inmovilidad se define como el tiempo que el animal permanece en una postura típica en la que solo realiza los movimientos necesarios para flotar y mantener la cabeza fuera del agua. Esta prueba fue llevada a cabo en luz roja. A cada animal se le somete a la prueba en dos días consecutivos, con las siguientes condiciones:

- 1) DIA 1: El animal nada durante 15 min. El observador registra las variables especificadas con anterioridad durante los 5 primeros minutos de la prueba. Esta es una fase donde, presumiblemente, se pone de manifiesto el componente emocional.
- 2) DIA 2: 24 horas después el animal nada durante 5 minutos, registrándose las conductas durante todo el tiempo que dura la prueba. En este segundo día de prueba puede existir un componente de aprendizaje.

Una vez finalizada la batería de pruebas comportamentales, se dejó un intervalo mínimo de 3 días de reposo para permitir la total recuperación del animal y evitar posibles interferencias de dichas pruebas con las variables inmunitarias que son analizadas con posterioridad.

3.2.1.2.2. Obtención de las muestras biológicas en ratones.

Obtención de la suspensión peritoneal. Recuento y viabilidad celular

Los leucocitos fueron obtenidos del peritoneo de los animales sin necesidad del sacrificio de los mismos, siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.30-10.00 h), mediante el siguiente protocolo:

- 1) *Sujeción del animal*: con los dedos pulgar e índice se sujetó al ratón por la piel de la parte posterior de la cabeza; se le dio la vuelta, colocándolo boca arriba y se inmovilizaron las extremidades inferiores sujetando la cola por su zona más anterior entre los dedos anular y meñique, y la palma de la mano.

- 2) *Inyección de un medio salino:* una vez inmovilizado el ratón, se le inyectó intraperitonealmente un volumen de 3 ml de solución de Hank estéril y atemperada a 37 °C, y se masajeó suavemente el abdomen.
- 3) *Obtención de la suspensión peritoneal:* La suspensión peritoneal va saliendo por el mismo orificio por el que fue introducida la solución de Hank, recogién dose aproximadamente el 90% del volumen inyectado, el cual se depositó en un tubo de vidrio estéril y se mantuvo en hielo.
- 4) *Recuento de las células de la suspensión peritoneal:* Las células obtenidas del peritoneo fueron principalmente linfocitos y macrófagos, en proporción aproximada del 59% y 39%, respectivamente. Los macrófagos y linfocitos fueron identificados por su morfología y tamaño característicos, y contabilizados por ml de suspensión utilizando un hemocitómetro de Neubauer y un microscopio óptico de contraste de fase.
- 5) *Viabilidad celular:* La viabilidad de las células obtenidas y utilizadas en los distintos ensayos fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán. Este colorante, en solución al 0,4%, se añadió 1:1 (v/v) a la suspensión celular e inmediatamente se contabilizaron en hemocitómetro de Neubauer las células que aparecían teñidas de azul (muertas) y las que no se encontraban teñidas (vivas). El test de viabilidad del azul tripán se hizo de forma rutinaria antes y después de la realización de cada ensayo. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, solamente se utilizaron las suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 98%.

Obtención de los órganos. Aislamiento de los leucocitos de órganos inmunocompetentes, recuento y viabilidad celular

Los animales fueron sacrificados en la fase oscura de su ciclo vital (8.00-14.00 h) por dislocación cervical de acuerdo con las directrices descritas en el Real Decreto 1201/2005.

Una vez sacrificados, se procedió rápidamente a la extracción de los órganos, que fueron liberados de las impurezas visibles y lavados cuidadosamente en PBS estéril. Cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, bazo y ganglios axilares internos y externos fueron inmediatamente congelados con Nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta el momento de su utilización.

También se obtuvieron muestras de sangre periférica, en un eppendorf heparinizado, mediante punción en la arteria carótida, de la que se obtuvo el plasma

mediante centrifugación durante 20 min a 1000 g. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -20 °C hasta el momento de su estudio.

En el caso de los órganos inmunocompetentes timo y bazo, se realizaron ensayos de función inmunitaria para los que se emplearon las muestras frescas, de las que se obtuvieron los leucocitos mononucleares siguiendo un protocolo descrito previamente (De la Fuente et al., 2004b).

El bazo se maceró en PBS estéril y a continuación se llevó a cabo una separación mediante gradiente de densidad con objeto de extraer los leucocitos mononucleares separadamente de otras células, principalmente del elevado número de hematíes presentes en el macerado. Para ello, se depositó el macerado en un tubo conteniendo 3 ml de Histopaque de densidad 1,077 g/ml y se centrifugó durante 20 min a 1100 g. El halo de leucocitos mononucleares, formado principalmente por linfocitos, se extrajo con ayuda de pipeta Pasteur y se depositó nuevamente en un tubo con PBS estéril, realizándose un lavado de 10 min a 300 g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio RPMI sin rojo fenol. El procedimiento a seguir para el timo fue similar, con la excepción de que no fue necesario separar las células por gradiente de densidad dado el bajo grado de contaminación por hematíes u otros tipos celulares. Por último, se procedió al recuento del número de células y comprobación de su viabilidad. Sólo se utilizaron las suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 98%.

3.2.1.2.3. Análisis de las subpoblaciones celulares presentes en las suspensiones peritoneales, y de la expresión en su membrana de receptores Toll 2 y 4.

La determinación, en muestras de la suspensión peritoneal, de las principales poblaciones leucocitarias presentes, mediante la expresión en la superficie de la membrana leucocitaria de diversos antígenos de diferenciación leucocitaria (CD), así como de receptores Toll de tipo 2 y 4 (TLR2, TLR4) en los mismos, se realizó mediante un sencillo marcaje de superficie con los siguientes anticuerpos monoclonales, a las concentraciones finales que se indican:

TLR2 conjugado con ficoeritrina (PE, eBioscience) ($1 \mu\text{g}/10^6$ células)

TLR4 conjugado con PE (eBioscience) ($1 \mu\text{g}/10^6$ células)

CD4 conjugado con PE-cianina (PE-Cy5, BD Pharmingen) ($1 \mu\text{l}/10^6$ células)

CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmingen) (1/100, v/v)

CD19 conjugado con FITC (BD Pharmingen) (2/100, v/v)

CD25 conjugado con FITC (BD Pharmingen) (1/100, v/v)

CD11b conjugado con FITC (CALTAG Laboratories) (1/100, v/v)

CD11c conjugado con FITC (BD Pharmingen) (1/100, v/v)

De este modo, tras obtener la suspensión peritoneal, ésta se centrifugó a 400 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 ml de medio PBS-BSA (1%). El BSA disminuye la unión inespecífica por parte de los anticuerpos. Tras el recuento celular, se procedió a preparar alícuotas de 3×10^5 células, que son las que se emplearon para el marcaje, en base a la mínima cantidad de células que es necesario adquirir en el citómetro. Una vez preparadas, se centrifugaron a 560 g durante 10 min, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se añadió un volumen de 30 μ l con la mezcla de anticuerpos correspondiente (TLR2/CD4/CD8, TLR4/CD4/CD8, TLR2/CD19, TLR4/CD19, TLR2/CD25, TLR4/CD25, TLR2/CD11b, TLR4/CD11b, TLR2/CD11c, TLR4/CD11c). Asimismo, se prepararon tubos blancos y con marcajes simples para ajustar las condiciones del citómetro antes de empezar a adquirir las muestras, que en el caso de los anticuerpos frente a Antígenos de Diferenciación Leucocitarios también nos sirvieron para conocer los porcentajes de leucocitos principales presentes en la suspensión peritoneal.

Las alícuotas con las mezclas de anticuerpos se incubaron durante 30 min en frío y en oscuridad y, pasado ese tiempo, se realizan dos lavados (añadiendo PBS-BSA y centrifugando a 560 g durante 5 minutos y a 4°C) para retirar el exceso de anticuerpo no unido, tras lo cual las células se resuspendieron en 300 μ l del mismo tampón e inmediatamente se adquirieron en el citómetro de flujo (FACSCalibur Flow Cytometer, Becton Dickinson). El análisis de resultados se realizó con ayuda del software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los resultados se expresaron como % respecto al total de células en el caso de la expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria, y como % de células que expresan uno u otro de los TLRs analizados dentro del total de cada tipo celular.

3.2.1.2.4. Estudio de funciones inmunitarias.

La capacidad funcional de las **células fagocíticas** implica, además del proceso de ingesta del material extraño, una serie de etapas que se desarrollan con anterioridad y que se continúan tras el mismo. Estas células se adhieren al endotelio como paso previo a la

diapédesis, que les permite movilizarse hacia el foco infeccioso, dirigidas por un gradiente de moléculas atrayentes (quimiotaxis). Una vez en contacto con el material extraño, se unen a él, de forma espontánea o a través de factores séricos (opsoninas), y lo ingieren. A continuación, el material ingerido es destruido, digiriéndose mediante un proceso que, fundamentalmente, requiere actividad metabólica oxidativa y en el que se producen radicales libres de oxígeno, el primero de los cuales es el anión superóxido. Los macrófagos de la **suspensión peritoneal** se ajustaron a 5×10^5 macrófagos/ml de medio Hank (De la Fuente, 1985; Puerto et al., 2002; Alvarado et al., 2006a), con excepción de la alícuota destinada a la valoración de las ROS, en que la suspensión peritoneal se ajustó a 10^6 células totales/ml (Puerto et al., 2002; Alvarado et al., 2006a).

En **linfocitos**, se analizó una de sus funciones más características, su capacidad proliferativa, y otras que son compartidas con las células fagocíticas, como son la capacidad de adherencia y la movilidad dirigida (quimiotaxis). Los linfocitos se adhieren a los endotelios y recirculan por el organismo utilizando su capacidad de movilidad. Ambas actividades son previas y necesarias para que tenga lugar el reconocimiento antigénico que inicia la respuesta defensiva, y que se sigue fundamentalmente con la proliferación de los linfocitos activados. Además, junto con las células NK, los linfocitos T CD8+ y las células NKT, realizan una importante función citotóxica. Las suspensiones de linfocitos **tímicos y esplénicos**, se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas se ajustó en medio completo para el ensayo de respuesta proliferativa. La segunda alícuota se ajustó en RPMI sin rojo fenol, para la valoración de la quimiotaxis y la actividad citotóxica *Natural Killer* (NK). La concentración final de células en ambos casos fue de 10^6 linfocitos/ml (De la Fuente et al., 2004b). Por su parte, la **suspensión peritoneal** fue ajustada a 5×10^5 linfocitos/ml Hank para la valoración de estas funciones, con excepción de la alícuota destinada a la valoración de la actividad NK, que se ajustó a 10^6 leucocitos totales/ml RPMI sin rojo fenol (Puerto et al., 2002; Alvarado et al., 2006a). La cantidad de células que se obtienen de la suspensión peritoneal es muy limitada, y por ello, se optimiza al máximo la concentración de células que se emplea en cada ensayo. Este problema no existe en el caso de los órganos inmunocompetentes, en que la concentración de células que se obtiene es muy abundante.

Sequidamente se expone la metodología utilizada para el estudio de cada una de las funciones estudiadas en los macrófagos y linfocitos peritoneales, así como en linfocitos procedentes de órganos inmunocompetentes murinos. Cada ensayo, correspondiente a un individuo y una toma de muestra, fue realizado por duplicado o triplicado.

Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos

La movilidad inducida o quimiotaxis de las células fagocíticas y de los linfocitos se evaluó siguiendo la técnica descrita por Boyden (1962) y Fontan et al. (1976), ligeramente modificada por De la Fuente et al. (1997), basada en que estos tipos celulares poseen la capacidad de desplazarse hacia un gradiente químico formado por el péptido formilado (Snyderman y Pike, 1984; Schubert y Muller, 1989).

Se utilizaron cámaras de metacrilato similares a la de Boyden, con dos compartimentos (de 9 mm de diámetro interno y 13 mm de diámetro externo), separados por un filtro de nitrocelulosa de 3 μm de tamaño de poro. En el compartimento inferior se introdujo el agente quimioatrayente, esto es, alícuotas de 400 μl de péptido formilado (f-MLP) a la concentración de 10^{-8} M (Snyderman y Pike, 1984). Adicionalmente, para la valoración de la movilidad espontánea como control interno de la técnica, se introdujeron 400 μl de solución de Hank en dicho compartimento inferior de la cámara de Boyden. En el superior se depositaron alícuotas de 300 μl de la suspensión peritoneal ajustada a 5×10^5 macrófagos/ml o 5×10^5 linfocitos/ml, en cada caso, o 10^6 linfocitos/ml cuando se trataba de órganos inmunocompetentes, en solución de Hank o RPMI sin rojo fenol, respectivamente.

Las cámaras se incubaron durante 3 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 y humedad a saturación. Tras la incubación, los filtros, en los que han quedado retenidas las células que han migrado hacia el gradiente creado por el quimioatrayente o de forma espontánea, fueron recogidos, fijados y teñidos mediante el siguiente protocolo: 1) Alcohol metílico 50% 5 min; 2) Alcohol etílico 75% 5 min; 3) Agua ultrapura 2 min; 4) Eosina-azul de metileno 45 min; 5) Agua ultrapura 2 min.

Posteriormente, los filtros se colocaron en portaobjetos con la cara inferior hacia arriba y se protegieron con cubreobjetos. Se contabilizó, al microscopio con objetivo de inmersión (100x), el número de macrófagos y de linfocitos peritoneales, en cada caso, que aparecen en dicha cara inferior realizando 4 barridos de 5mm cada uno (con lo que se recorre aproximadamente 1/3 de la superficie total del filtro). En el caso de los linfocitos murinos de timo y bazo se hicieron 5 barridos de 5 mm. El valor obtenido en dichos recuentos se denomina Índice de Quimiotaxis (IQ).

Capacidad de fagocitosis de los macrófagos

Para valorar la capacidad de ingesta de cuerpos extraños (bolas de látex) que tienen los fagocitos, se empleó la técnica descrita por De la Fuente (1985). Se dispensaron en placas MIF alícuotas de 200 μ l de la suspensión peritoneal ajustada a 5×10^5 macrófagos/ml en solución de Hank. Se incubaron a 37°C durante 30 min, con lo que se obtiene una monocapa de fagocitos en el fondo del pocillo, que se lavó posteriormente con PBS atemperado a 37°C para eliminar las células no adheridas. Seguidamente, se añadieron 200 μ l de solución de Hank y 20 μ l de látex (1,091 μ m de diámetro) al 1% en PBS, y se incubaron de nuevo a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se lavó exhaustivamente con PBS a 37°C para arrastrar el látex no fagocitado. Las células se fijaron con metanol al 50% (5 min) y se tiñeron con eosina-azul de metileno (20 min). Finalmente, se lavó con abundante agua ultrapura para eliminar el exceso de colorante. Una vez secas las placas, se procedió al recuento en el microscopio óptico, con objetivo de 100 aumentos, del número de partículas ingeridas por 100 fagocitos tomados al azar, obteniendo así el Índice de Fagocitosis (IF). Además, se determinó el porcentaje de células, en las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula, lo que se denomina Eficacia Fagocítica (EF).

Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intraleucocitarios

Los macrófagos son los principales productores de radicales libres en la suspensión peritoneal, si bien también las células NK y en menor medida los linfocitos, son capaces de ello. La valoración de los niveles de ROS intracelulares se llevó a cabo mediante una técnica fluorimétrica previamente descrita y modificada ligeramente en nuestro laboratorio (Puerto et al., 2002). Se empleó el diacetato 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF -DA), que es un compuesto no fluorescente y estable que atraviesa la membrana celular por su carácter apolar, y es desacetilado en el interior de la célula, quedando atrapado en el citoplasma celular. Allí es rápidamente oxidado en presencia de diversas especies reactivas de oxígeno, principalmente H_2O_2 , dando lugar a un compuesto altamente fluorescente, la 2'-7'-diclorofluoresceína.

Se dispensaron alícuotas de 200 μ l de la suspensión peritoneal ajustada a 10^6 leucocitos/ml en placas negras de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron 30 min a 37 °C en oscuridad. A continuación, se realizó otra incubación con 20 μ l de la sonda H_2DCF -DA a una concentración de 1 mM en el pocillo, durante 15 min. La sonda se añadió a todos los pocillos con excepción de los destinados a la medida de la autofluorescencia.

Transcurrido este tiempo se añadieron 20 μ l de forbol-miristato-acetato (PMA; 5 ng/ml en pocillo), como estímulo para la producción de ROS, o 20 μ l de Hank para la medida de los niveles basales. Tras otros 15 min de incubación en las mismas condiciones, se procedió a medir la cantidad de fluorescencia en el fluorímetro de placas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. Los resultados se expresaron como % de estimulación respecto del valor basal control (sin PMA), una vez sustraído en todos los casos el valor de la autofluorescencia. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

La actividad más característica de los linfocitos es su capacidad de respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos. Para estudiarla se empleó el test de transformación linfoblástica (TTL) en respuesta a mitógenos, siguiendo una metodología estandarizada (Del Río et al., 1994; Carrasco et al., 1997; De la Fuente y Víctor, 2000; De la Fuente et al., 2004; Alvarado et al., 2006a). Este ensayo analiza *in vitro* la repuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Éstos sintetizan ADN, por lo que añadiendo un precursor de la síntesis marcado, como timidina marcada con tritio, puede cuantificarse el crecimiento.

Para el estudio de la respuesta proliferativa en linfocitos murinos de timo y bazo, se sembraron 10^6 linfocitos/ml medio completo (RPMI 1640 con 1% gentamicina, 0,1 mg/ml, y suplementado con 10% suero fetal de ternera descomplementarizado), en alícuotas de 200 μ l, en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano. En el caso de la suspensión peritoneal, se sembraron 5×10^5 linfocitos/ml en las mismas condiciones. En los pocillos destinados a determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a un mitógeno dado, se adicionaron 20 μ l de concanavalina A (ConA) a una concentración de 1 μ g/ml en pocillo o de lipopolisacárido (LPS) a esa misma concentración (1 μ g/ml en pocillo). Previamente, se comprobó que dichas concentraciones se corresponden con las que producen una estimulación de la repuesta proliferativa óptima. En los pocillos para la valoración de la proliferación espontánea, se añadieron 20 μ l de medio completo. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂, en una atmósfera saturada de humedad. Transcurrido ese tiempo, se observó al microscopio óptico invertido la aparición de blastos. En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad. A continuación, se

recogieron 100 μ l del sobrenadante de cada pocillo para la valoración posterior de citoquinas. Seguidamente, se añadieron en cada pocillo 5 μ l de ^3H -timidina (2,5 $\mu\text{Ci/pocillo}$) y se renovó el medio completo adicionando 100 μ l de medio fresco. La incubación se prolongó durante 24 h más, tras las que se recolectaron las células de cada pocillo en filtros con un recolector de células semiautomático, lavando los pocillos tres veces con agua ultrapura. Los filtros se dejaron secar y se colocaron en viales de centelleo a los que se añadió 5 ml de líquido de centelleo. La timidina incorporada por los linfocitos se midió en un contador β de centelleo líquido, del que se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En la expresión de los resultados, se calculó la media aritmética de cpm en cada triplicado.

Actividad citotóxica Natural Killer (NK)

Como se comentó previamente, las células NK, los linfocitos T CD8+, las células NKT, y también los macrófagos, pueden realizar funciones citotóxicas. En la presente tesis se valoró la capacidad citotóxica, concretamente la llamada citotoxicidad natural o NK, de los leucocitos peritoneales murinos y de los extraídos de órganos inmunocompetentes. Esta actividad les permite destruir *in vitro* de forma espontánea (sin sensibilización previa ni presencia de anticuerpos), células tumorales. Para analizar esa capacidad lítica se utilizan como células dianas líneas tumorales procedentes de la misma especie de la que se obtienen los leucocitos que se quieren estudiar. En nuestro caso, se utilizaron como diana células YAC-1 procedentes de un linfoma murino para la valoración en ratón, las cuales fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se hicieron crecer en cultivo antes de su utilización. Dicho cultivo se realizó en frascos estériles mantenidos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 , con atmósfera saturada de humedad. El medio de cultivo consistió en RPMI enriquecido con un 10% de suero fetal bovino descomplementarizado y suplementado con 1% de gentamicina (0,1mg/ml), que era renovado cada dos días. Para ello, las células se lavaban a 300 g durante 10 min, desechándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento para el recuento y comprobación de la viabilidad celular mediante el test de exclusión de colorante vital azul tripán. La evolución del cultivo se controlaba periódicamente también mediante observación al microscopio invertido, comprobando su crecimiento y la ausencia de posibles contaminaciones microbiológicas.

Para determinar la actividad NK se utilizó un kit colorimétrico comercializado (PROMEGA) que se basa en la detección y valoración de la actividad de la enzima lactato

deshidrogenasa (LDH), liberada al sobrenadante por las células lisadas, es decir, por la citólisis de las células diana. Para la realización del ensayo se siguió una metodología previamente descrita (Ferrández et al., 1999). Las células diana, previamente cultivadas, se lavaron durante 10 min a 300 g. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de RPMI sin rojo fenol, evitando así interferencias en la posterior detección colorimétrica, y se comprobó su viabilidad mediante el test de exclusión del azul tripán. Las células diana se ajustaron a 10^5 células vivas/ml RPMI sin rojo fenol. Las células efectoras, leucocitos peritoneales y leucocitos mononucleares de bazo y timo, se ajustaron a 10^6 células/ml, para obtener una relación efectoras:diana de 10:1. Una vez ajustadas las suspensiones, se dispensaron 100 μ l en placas de 96 pocillos con fondo en U, a los que se añadieron 100 μ l de la suspensión de células diana. Además se incluyeron pocillos en los que únicamente se adicionaron células diana, para cuantificar la lisis espontánea y total de las mismas, y sólo células efectoras, para la determinación de su lisis espontánea. Estos pocillos se completaron con 100 μ l de RPMI sin rojo fenol. Las placas se centrifugaron a 250 g durante 5 min, con objeto de favorecer los contactos celulares, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, con atmósfera saturada de humedad, durante 4 horas. Transcurridas 3 h y 15 min de incubación, se añadieron 20 μ l de solución de lisis (HCl) o detergente (Tritón X-100) en los pocillos destinados a cuantificar la lisis total de las células diana. Tras las 4 horas de incubación indicadas, se centrifugaron de nuevo las placas en las mismas condiciones anteriores y se recogieron 50 μ l de los sobrenadantes, que se pasaron a una placa de 96 pocillos con fondo plano, que permite la posterior medida en el lector de placas. A cada pocillo se añadieron 50 μ l de una mezcla de sustratos de la enzima LDH (lactato, diaforasa y NAD⁺), incubándose la placa 30 min más a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm, lo cual nos proporcionó la actividad de la LDH en los sobrenadantes.

El porcentaje de lisis se calculó como sigue:

$$\% \text{lisis} = \frac{(\text{lisis problema} - \text{lisis espontánea}_{\text{efectoras}} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}})}{(\text{lisis total} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}})} \times 100$$

siendo: la lisis problema, la media de las absorbancias obtenidas en los pocillos donde se incubaron células efectoras junto con células diana; la lisis espontánea, la media de las absorbancias obtenidas en los pocillos sembrados solo con células diana o con células efectoras; y la lisis total, la media de las absorbancias obtenidas en los pocillos conteniendo células diana, a los que se añadieron 20 μ l de solución de lisis o Tritón X-100.

En cada experimento se realizan los ensayos por triplicado, utilizándose en la ecuación la media de las absorbancias obtenidas para cada tipo de lisis.

3.2.1.2.5. Estudio de los niveles de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos.

Las citoquinas son importantes moduladores de la compleja red de interacciones celulares que regula la respuesta inmunitaria. Por su parte, la función esencial de las quimioquinas es la de estimular la función quimiotáctica de los leucocitos.

Todos los sobrenadantes de cultivo destinados a la valoración de los niveles de citoquinas fueron mantenidos a -20 °C, descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000 g antes de su valoración, para eliminar partículas y agregados.

El estudio de los niveles de esos factores se llevó a cabo en los sobrenadantes de cultivos a través de dos métodos:

1) ELISA de fase sólida

Las muestras, los estándares y los controles de concentración conocida de cada citoquina se incorporaron a una placa de ensayo adsorbida con un anticuerpo específico frente a dicha citoquina de ratón. El principio fue similar para todos los análisis de los niveles de las citoquinas determinadas mediante esta técnica, con variaciones que se detallan e ilustran a continuación.

Niveles de IL-2 inducidos por ConA en sobrenadantes de cultivos

En el caso de la IL-2, los niveles de esta citoquina en sobrenadantes de leucocitos peritoneales, y de linfocitos esplénicos y tímicos, se determinó siguiendo el método descrito previamente por Medina et al. (2000) y De la Fuente et al. (2004). Alícuotas de 100 µl de sobrenadante, recogidos en los pocillos de las placas de cultivo de los leucocitos tras 48 horas de incubación en presencia de ConA, se almacenaron a -20°C hasta la valoración en las mismas de la concentración de IL-2 mediante kits ELISA comerciales, cuyos componentes fueron mantenidos a 4 °C hasta el momento de realización de los ensayos.

La técnica desarrollada se ilustra brevemente en la figura 9.

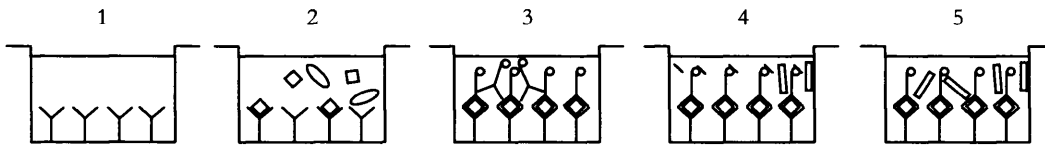


Figura 9. Sandwich ELISA de fase sólida para valoración de IL-2 de ratón. 1) Anticuerpo policlonal frente a IL-2 de ratón adsorbido al fondo del pocillo. 2) Incubación a T° ambiente con la muestra y posterior lavado de las sustancias libres. 3) Incubación a T° ambiente con anticuerpo policlonal frente a IL-2 de ratón conjugado con peroxidasa. Lavado. 4) Incubación a T° ambiente y oscuridad con sustrato: H₂O₂ + tetrametilbenzidina (TMB). Aparición de producto coloreado. 5) Solución *stop*: solución diluida de ácido hidrocórico.

Niveles de TNF- α inducidos por LPS en sobrenadantes de cultivos

En el caso del TNF- α , su concentración se determinó en los sobrenadantes de los cultivos de leucocitos peritoneales, y de linfocitos de bazo y de timo tras 48 horas de incubación en presencia de LPS. El ELISA (Fig. 10) se desarrolló como se ilustra a continuación:

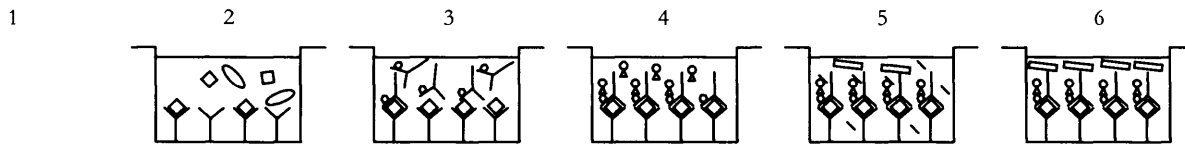


Figura 10. Sandwich ELISA de fase sólida para valoración de TNF- α de ratón. 1) Anticuerpo frente a TNF- α de ratón adsorbido al fondo del pocillo. 2) Incubación a 37 °C con la muestra. Lavado. 3) Incubación a T° ambiente con anticuerpo frente a TNF- α de ratón biotinilado. Lavado. 4) Incubación a T° ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Lavado. 5) Incubación a T° ambiente y oscuridad con sustrato: solución de tetrametilbenzidina (TMB). 6) Solución *stop*: ácido cítrico 2 M.

Una vez añadida la solución *stop*, las burbujas de aire fueron eliminadas y se midió la absorbancia a 450 nm. En el caso de la IL-2, la medida de la absorbancia a 450 nm se corrigió con la medida a una longitud de onda de 540 nm o 570 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml. A continuación se indican las características generales de los ELISAs:

Tabla 3. Características generales de los ELISAs empleados para la valoración de citoquinas en ratón.

ELISA	IL-2	TNF- α
Mínimo detección (pg/ml)	<3	<10
Rango (pg/ml)	15,6-1000	8-2000
Precisión intra-ensayo (pg/ml)	3,9-5,5	-
Precisión inter-ensayo (pg/ml)	4,4-5,1	-

2) Luminometría

Se empleó el kit “Beadlyte[®] mouse 21-Plex Cytokine Detection System” (Upstate), que permite la detección simultánea (MULTIPLEX) en una misma muestra de 21 citoquinas diferentes, que incluyen citoquinas pro- y anti-inflamatorias, factores de crecimiento y citoquinas reguladoras, y quimioquinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , KC, TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , RANTES y VEGF.

En esta determinación, se emplearon alícuotas de 50 μ l de los sobrenadantes de cultivos de 48 h de leucocitos peritoneales tanto en reposo (cuya valoración será indicativa del estado inflamatorio en condiciones basales), como estimulados con los mitógenos ConA y LPS (cuya determinación será representativa de la respuesta funcional), que fueron añadidos en placa de 96 pocillos. Una vez adicionados el mismo volumen de los estándares y controles positivos, se añadieron a todos los pocillos 25 μ l de una solución conteniendo todos los anticuerpos monoclonales frente a las citoquinas de ratón previamente especificadas, cada uno de ellos unido a un número de microesfera diferente, que pueden ser detectadas en una misma reacción gracias a su clasificación mediante precisos ratios de dos fluoróforos. Para la cuantificación de la interacción biomolecular, se emplea una molécula indicadora unida a un tercer fluoróforo. Esto es, tras una incubación de 2 h con los anticuerpos conjugados con microesferas, en oscuridad y a temperatura ambiente, se aplicó vacío para eliminar el líquido, se lavó, y se añadieron 75 μ l de tampón y 25 μ l de una solución conteniendo los anticuerpos, conjugados con biotina, frente a las citoquinas especificadas con anterioridad. Estas soluciones incluyen BSA, Tween y azida sódica para evitar uniones inespecíficas y preservarlas hasta y durante su uso. Tras otra incubación de 1,5 h en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitador de placas, se añadieron 25 μ l de una solución conteniendo estreptavidina conjugada con ficoeritrina, que permite la posterior cuantificación. La placa se incubó 30 min en las mismas condiciones anteriores y se adicionó la solución *stop*, a base de formaldehído (0,2 %, v/v). Por último, se aplicó vacío y se añadió el fluido apropiado para pasar las muestras por el luminómetro (Sistema Luminex[®] 100TM). Los resultados se expresaron como pg/ml con ayuda del software de análisis de datos BeadViewTM.

Este kit tiene mayor sensibilidad y rango de linealidad que los ELISAs convencionales. Por esta razón, intentamos también la determinación de los niveles de citoquinas presentes en la propia suspensión peritoneal, previamente liberada de células,

pero los valores de éstas fueron indetectables. Las características, para el tiempo de incubación primaria especificado, son las siguientes:

Tabla 4. Características generales del MULTIPLEX empleado para la valoración de citoquinas en ratón.

<i>Citoquina</i>	Sensibilidad (pg/ml)	Rango (pg/ml)	% Recuperación (1000 pg/ml)
<i>IL-1α</i>	2,0	6,9-5000	100
<i>IL-1β</i>	1,7	6,9-7500	106
<i>IL-2</i>	0,3	6,9-5000	106
<i>IL-3</i>	<0,7	6,9-5000	110
<i>IL-4</i>	0,3	4,1-3000	105
<i>IL-5</i>	0,5	6,9-5000	103
<i>IL-6</i>	0,7	6,9-5000	107
<i>IL-9</i>	8,2	6,9-5000	105
<i>IL-10</i>	2,9	6,9-5000	111
<i>IL-12(p40)</i>	2,5	14-10000	104
<i>IL-12(p70)</i>	6,9	6,9-5000	107
<i>IL-13</i>	2,2	6,9-5000	130
<i>IL-17</i>	0,3	6,9-5000	114
<i>GM-CSF</i>	2,1	6,9-5000	114
<i>IFN-γ</i>	0,4	6,9-5000	109
<i>KC</i>	<1,1	6,9-5000	103
<i>MCP-1</i>	4,8	14-10000	109
<i>MIP-1β</i>	11	14-10000	106
<i>RANTES</i>	<1,14	6,9-5000	107
<i>TNF-α</i>	0,5	6,9-5000	107
<i>VEGF</i>	8,54	6,9-4000	98

3.2.1.2.6. Estudio del estrés oxidativo a nivel de compuestos oxidantes y antioxidantes en leucocitos peritoneales.

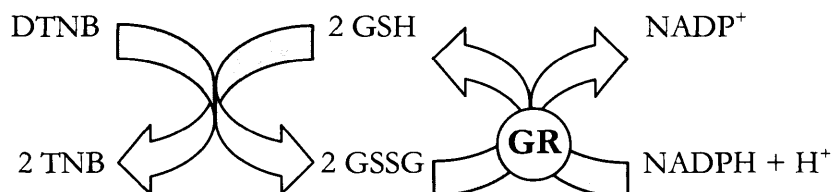
Marcadores de oxidación

Niveles de glutathion oxidado

El glutathion es el antioxidante más potente presente en el organismo, gracias a la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. La valoración del glutathion, tanto en su estado reducido (GSH) como en el oxidado (GSSG), es considerada un estimador muy fiable del grado de estrés oxidativo (Viña, 1990). Se determinó experimentalmente el glutathion total, formado mayoritariamente por su forma reducida, y el GSSG. Dada la similitud en la metodología empleada para ambos, ésta se expone conjuntamente, a pesar

de que conceptualmente GSSG y GSH han sido separados en marcadores de oxidación y defensas antioxidantes frente al mismo, respectivamente.

La valoración de GSSG y GSH se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Tietze (1969), que está fundamentada en el reciclado enzimático a través del que el glutathion es secuencialmente oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH, en presencia de la enzima glutathion reductasa (GR):



Para la determinación del contenido en glutathion total y oxidado de los leucocitos peritoneales murinos se siguió el método previamente descrito (Alvarado et al., 2006a; 2006b), las muestras fueron ajustadas a 10⁶ células/ml en solución de Hank, tomándose 2 alícuotas, una para cada valoración. Las células fueron entonces centrifugadas en frío (1100 g, 10 min, 4°C) y se desechó el sobrenadante.

Para la valoración del contenido en glutathion total intracelular, el sedimento de leucocitos se resuspendió en 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5% con HCl 0,01 N frío, que evita la autooxidación del GSH, sensible a pH y temperatura. Se sonicaron las células, también en frío, realizándose 3 ciclos de sonicación de 10 s cada uno al 70 % de la potencia máxima (70 W), y dejando 20 s de reposo entre ellos. A continuación, se añadieron 400 µl de solución de TCA, y la muestra se mantuvo en hielo. La solución de TCA se desoxigenó previamente burbujeándola con helio durante 10 min.

El sedimento destinado a la determinación de GSSG se resuspendió en 100 µl de tampón fosfato 50 mM pH 7,0 frío, previamente burbujeado, al que se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y n-etilmaleimida (NEM) 12,5 mM en el momento del ensayo. El NEM se utilizó para la derivatización del GSH, ya que reacciona con éste formando un complejo estable, que le previene de la posible autooxidación durante el procesamiento y consecuente sobrevaloración de los niveles de GSSG. Por su parte, el EDTA también contribuye a preservar los niveles de GSH, puesto que su oxidación es sensible a iones metálicos. Las células se sonicaron en frío, se añadieron 400 µl de solución de NEM y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. El NEM también puede inhibir la actividad de la enzima glutathion reductasa interfiriendo en la

posterior medida enzimática, por lo que el exceso de NEM que no se une al GSH ha de ser eliminado completamente del medio. Para ello, se siguió el método propuesto por Sacchetta et al. (1986) de hidrólisis alcalina con pequeñas modificaciones (Álvarez, 2006). Se alcalinizaron las muestras hasta valores de pH comprendidos entre 11 y 12, para lo que se añadieron 15 µl de KOH al 10%. El pH se comprobó con ayuda de micropH-metro. Es importante evitar que el pH alcance un valor superior a 12, a partir del cual el GSSG es inestable y podría ser infravalorado en la medida posterior. Transcurridos 5 min a temperatura ambiente, el NEM libre se hidrolizó completamente. Finalmente, se añadieron 280 µl de TCA al 5% con HCl 0,01N previamente burbujeado y en frío, alcanzándose valores de pH comprendidos entre 1 y 2.

A continuación todas las muestras (GSH y GSSG) se centrifugaron a 3200 g durante 5 min a 4 °C, y se procedió al análisis de los sobrenadantes. La absorbancia se midió en espectrofotómetro a 412 nm, durante 4 min cada 20 s y con 60 s de retardo inicial, dado que la forma reducida del DTNB, el 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), tiene un máximo de absorción a esta longitud de onda, y en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y GR 10 U/ml en tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM burbujeado; soluciones hechas en el momento del ensayo. También se realizaron medidas de la reacción sin muestra (sustituyendo ésta por solución de TCA o de NEM en cada caso) para evitar sobrevalorar el contenido de glutatión. Los valores obtenidos se restaron como factor de corrección. Así, se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

1) Reacción con muestra para valoración de:

GSH: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl GR.

GSSG: 500 µl muestra, 70 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl GR.

2) Reacción sin muestra:

GSH: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl solución de TCA y 70 µl GR.

GSSG: 500 µl solución de NEM, 70 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl GR.

3) Blanco:

GSH: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl solución de TCA.

GSSG: 500 µl muestra, 70 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl solución de NEM.

Se realizó la curva patrón, en las mismas condiciones que las muestras, a partir de una solución madre que contenía 16 mg de GSH en 250 ml de solución de TCA de la que

se hicieron sucesivas diluciones en tampón fosfato con EDTA 6,3 mM. Los resultados de GSH fueron expresados como nmol/10⁶ células, con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{nmol GSH}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción con muestra- $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción sin muestra.

$(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003$: pmol GSH en cubeta.

X: número de células equivalente a los 70 μl de muestra valorados ($1,4 \times 10^5$ células).

El cálculo de los resultados del contenido en GSSG celular se realizó como sigue:

$$\text{nmol GSSG}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X) \times (1/7,14)$$

siendo:

X: número de células equivalente a los 500 μl de muestra valorados ($6,29 \times 10^5$)

(1/7,14): factor de corrección debido al mayor volumen de muestra que se empleó para la medida con respecto a la curva patrón, con objeto de permitir la detección del GSSG, dado su bajo contenido en la misma ($50/7=7,14$).

Finalmente, los valores de GSH se obtuvieron restando los valores de GSSG al glutatión total.

Actividad xantina oxidasa

La enzima xantina oxidasa (XO) es clave en el catabolismo de las purinas. Esta enzima cataliza la oxidación de las bases de purina a ácido úrico en una reacción en que las ROS se encuentran entre los productos finales. También puede actuar como NADH oxidasa. Para su estudio, se emplearon alícuotas de 50 μl de la suspensión peritoneal ajustada a 10⁶ leucocitos/ml de medio Hank, que fueron lisadas mediante congelación-descongelación a -20 °C.

El análisis de la actividad de la enzima XO se llevó a cabo mediante un ensayo fluorométrico utilizando el kit comercial “Amplex Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay Kit” (Molecular Probes). Este kit se basa en la capacidad de la enzima XO de producir el radical libre anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) como consecuencia de su actividad normal en la ruta de catabolismo de las purinas (xantina), dando lugar a ácido úrico. Cuando se añade la mezcla de reacción, el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido por la XO se degrada espontáneamente, dando lugar a la aparición de H_2O_2 . Éste a su vez, en presencia de peroxidasa de rábano, reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex Red y genera así un compuesto de oxidación fluorescente rojo, la resorufina. La resorufina presenta una fluorescencia de emisión

máxima a 585 nm y alto coeficiente de extinción ($54000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Después de 30 min de incubación en oscuridad, se midió la fluorescencia en un lector de placas en una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 595 nm. Se realizaron curvas patrón con xantina a diferentes concentraciones. A partir de dichas rectas se obtuvieron las expresiones de los niveles de actividad de la enzima. Los resultados se expresaron en miliunidades internacionales (mU) de actividad enzimática por mg de proteína. Pueden detectarse niveles de hasta 0,1 mU/ml of XO.

El contenido en proteína de esas mismas muestras fue evaluado mediante el método del ácido bicinónico (BCA), que es similar al procedimiento Lowry en que ambos se basan en la formación de complejos Cu^{2+} -proteína en condiciones alcalinas, a lo que sigue la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . La cantidad de reducción es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. El BCA forma un complejo púrpura-azul con el Cu^{1+} en ambientes alcalinos, proporcionando una base para monitorizar la reducción por parte de las proteínas del Cu^{2+} alcalino. Después de 30 min de incubación, se mide la absorción en la región 560 nm.

Defensas antioxidantes

Niveles de glutatión total

Las muestras fueron procesadas y medidas según el protocolo descrito previamente.

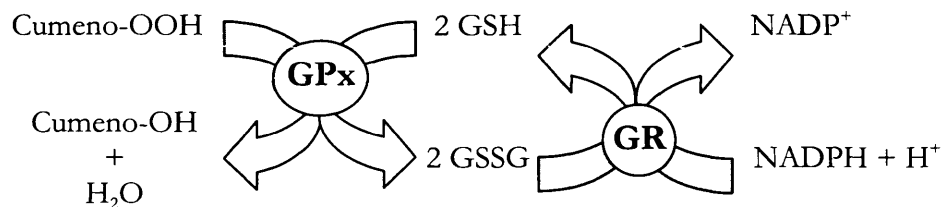
Actividad de enzimas antioxidantes

De las diferentes enzimas con capacidad antioxidante presentes en los leucocitos, que les permiten neutralizar los radicales de oxígeno que producen, en la presente tesis doctoral se escogió valorar la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx), componente del ciclo del glutatión, y de la catalasa (CAT). El procesamiento inicial fue común para ambas (Alvarado et al., 2006a; 2006b). Una vez obtenida la suspensión peritoneal, se ajustó a 10^6 células totales/ml en solución de Hank. Se tomaron alícuotas de 1 ml de dichas suspensiones (10^6 células) para la realización de los análisis enzimáticos, que fueron centrifugadas 10 min a 4 °C y 1100 g. Se desechó el sobrenadante, y el pellet de células peritoneales de ratón se resuspendió en 100 µl de tampón fosfato 50 mM pH 7,0, previamente burbujeado con helio durante 10 min. Se sonicó en frío en las condiciones descritas con anterioridad. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 3200 g durante 20

min a 4 °C, realizándose el ensayo con el sobrenadante. La actividad GPx y CAT se valoró espectrofotométricamente en microcubetas de vidrio óptico (región visible) o de cuarzo (región UV), respectivamente, con un paso de luz de 1 cm. Las soluciones necesarias se prepararon también en el citado tampón fosfato burbujado. Tanto soluciones como células fueron mantenidas en frío, y sólo previo paso a la medida de las actividades enzimáticas fueron atemperadas a temperatura ambiente para permitir la activación de las enzimas y la medida de las reacciones, también a temperatura ambiente.

Glutation peroxidasa

La valoración de la actividad glutathion peroxidasa se realizó según la técnica de Lawrence y Burk (1976) con ligeras modificaciones (Alvarado et al., 2006a; 2006b; Álvarez, 2006), a través de la cual se mide la actividad total del enzima utilizando hidroperóxido de cumeno (cumeno-OOH) como sustrato. Mediante este método se determina la tasa de oxidación del glutathion (GSH) producida por el cumeno-OOH, en una reacción catalizada por la enzima glutathion peroxidasa, gracias al descenso de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADPH, en presencia de un exceso de glutathion reductasa (GR):



Para el ensayo se prepararon en el momento las siguientes soluciones:

- 1) Solución reactiva (en tampón fosfato): EDTA 1 mM, Azida sódica 4 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 4 mM, GR 1 U/ml solución. Se burbujó previo a su uso, manteniéndose en oscuridad.
- 2) Hidroperóxido de cumeno 0,71 mM (en tampón fosfato).

Es necesario considerar que la reacción entre el hidroperóxido de cumeno y el GSH puede producirse aún en ausencia de enzima GPx. Por ello, para evitar una posible sobrevaloración de dicha actividad enzimática, se realizó una reacción en ausencia de muestra, que se denominó reacción no catalizada y permitió la cuantificación de la reacción espontánea.

Las medidas se realizaron en microcubetas de vidrio óptico conteniendo:

- 1) Reacción catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de muestra y 25 µl de solución de hidróperóxido de cumeno. Como blanco se empleó una mezcla formada por 675 µl de solución reactiva y 25 µl de muestra.
- 2) Reacción no catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de tampón fosfato y 25 µl de solución de hidróperóxido de cumeno. En este caso el blanco se obtuvo con 675 µl de solución reactiva y 25 µl de tampón fosfato.

Antes de añadir el hidróperóxido de cumeno, ambas reacciones se incubaron durante 5 min a 37 °C. La reacción se inició en el momento de la adición del hidróperóxido de cumeno en la cubeta, monitorizándose el descenso de absorbancia a 340 nm a partir de ese momento cada 40 s y durante un total de 5 min.

El cálculo de la actividad GPx se realizó según la expresión que se indica a continuación, siendo los resultados expresados en mU.I./10⁶ células [mU.I.=1/(nmol NADPH/cm)]:

$$\text{mU.I. GPx}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F/E] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción catalizada - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción no catalizada

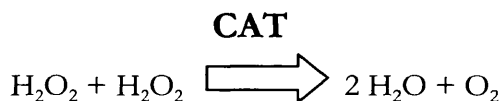
F: factor de dilución de la muestra en la cubeta (700/25=28).

E: coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

X: número de células equivalente a los 25 µl de muestra valorados ($2,5 \times 10^5$).

Catalasa

La determinación de la actividad de la enzima catalasa se llevó a cabo según la técnica descrita por Beers y Sizer (1952), con pequeñas modificaciones (Alvarado et al., 2006a; 2006b; Álvarez, 2006). Este método se basa en el descenso de la absorbancia a 240 nm por unidad de tiempo, debido a la descomposición del H₂O₂ por la actividad catalasa:



Las medidas se realizaron en microcubetas de cuarzo conteniendo:

-670 µl de H₂O₂ 14 mM, preparado en el momento en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 burbujeado, y mantenido en hielo y oscuridad.

-30 µl de muestra, que fue sustituida por tampón fosfato para el blanco.

Se estudió la cinética de la reacción llevando a cabo la medida en espectrofotómetro a 240 nm y temperatura ambiente, desde su inicio cada 20 s y durante un total de 80 s, dado el corto intervalo de tiempo en que se produce la desactivación de la enzima. Los resultados se expresaron en U.I./10⁶ células [U.I.=1/(µmol H₂O₂/cm)] y fueron calculados según la ecuación:

$$\text{U.I. CAT}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (10^6 / X)$$

siendo:

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta (70/3=23,33).

ε: coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm (43,6x10⁻³ mM⁻¹ cm⁻¹).

X: número de células equivalente a los 30 µl de muestra valorados (3x10⁵).

3.2.1.2.7. Estudio de la activación del factor nuclear de transcripción κ B (NF κ B) en extractos nucleares de leucocitos peritoneales.

El NF κ B es un factor de transcripción, cuya activación se produce en condiciones oxidativas e inflamatorias, conduciendo a su vez a la expresión de una variedad de genes que codifican para citoquinas, especialmente inflamatorias, aumentando como consecuencia el estrés oxidativo e inflamatorio. La activación del NF κ B se ha hipotetizado como máximo exponente de la oxidación-inflamación crónica con el envejecimiento, pero por el momento se desconoce si esta afirmación es cierta.

Aislamiento de extractos nucleares

Los extractos nucleares y citoplásmicos de los leucocitos peritoneales fueron aislados de la manera descrita por Lernbecher et al. (1993). Brevemente, las células se sedimentaron y se lavaron con PBS dos veces, mediante la adición de 1 ml de PBS en el mismo tubo eppendorf y centrifugación a 1500 rpm en microfuga durante 5 min a 4 °C, para eliminar los nucleos rotos y los restos celulares. A continuación, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0,4 ml de un tampón hipotónico (HEPES 10mM pH 7,9, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, 10mM KCl, y justo antes de su uso se añadió ditiotreitól (DTT) 1mM, como agente reductor, y fenilmetilsulfonil-floruro (PMSF) 0,7 mM, para inhibir a las proteasas) con baja concentración de sal, que permite la ruptura celular sin fragmentación de los núcleos. Las células se incubaron con dicho tampón en

hielo durante 15 min. A continuación, se añadieron 16,7 μ l del detergente NP-40 al 10 %, se vorteo suavemente, y las muestras se centrifugaron a 4000 rpm en microfuga durante 5 min y a 4 °C. Los sobrenadantes de esta centrifugación son los extractos citoplásmicos. Los sedimentos, que contienen los núcleos, se resuspendieron en 50 μ l de un tampón (HEPES 20mM pH 7,9, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, NaCl 0,4 M, y justo antes de su uso se añadió DTT 1mM y PMSF 0,7 mM) con alta concentración de sal, que permite la ruptura de las membranas nucleares. Las muestras se incubaron con este tampón en hielo durante 15 min. Posteriormente, se centrifugaron en frío a 15000 rpm en microfuga durante 5 min, y se recogieron los sobrenadantes, que contienen los extractos nucleares. Se introdujeron en tubos limpios, se tomaron alícuotas para la medida de la cantidad de proteínas mediante el método BCA, y las muestras se congelaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Marcaje de oligodeoxinucleótidos

Se siguió el protocolo descrito por Tato et al. (2006). Antes de la realización de los ensayos de variación de movilidad electroforética se realizó el marcaje de los oligodeoxineucleótidos. Para ello, se incubaron en primer lugar las cadenas sencillas, sentido (2pmol/ μ l) y antisentido (2pmol/ μ l), del oligonucleótido durante 20 min a 37 °C, tras lo cual se mantuvieron 10 min a temperatura ambiente. Como resultado, se obtienen los oligodeoxinucleótidos de doble cadena, correspondientes a la región palindrómica «B (5'-GGGAATTCCC-3'), que se marcaron mediante el relleno de las terminaciones superpuestas con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y [32 P]dCTP (3000 Ci/mmol). A la mezcla se añadió también dATP, dTTP y dGTP (5 mM). Tras una incubación de 40 min a 30 °C, se añadió dCTP (0,5 mM) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Los nucleótidos no incorporados y el resto de componentes de la reacción se eliminaron mediante purificación en columna G 25 y centrifugación a 2000 rpm en microfuga durante 3 min. Una alícuota de 1 μ l del oligonucleótido marcado se midió en el contador Beta para determinar su radiactividad.

Ensayo de variación de movilidad electroforética (EMSA)

El Oligonucleótido marcado (10^5 cpm) se incubó con 6 μ g del extracto de proteínas nucleares (cantidad que fue necesario ajustar previamente a la realización de los experimentos) y 2 μ g de poli(dI-dC), que evita las uniones inespecíficas, en un tampón conteniendo HEPES 20 mM pH 7,9, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 17 % de glicerol, y al que

se añadió previamente a su uso DTT 1 mM y PMSF 0,7 mM. De manera opcional, pueden adicionarse 2 μ l de este tampón conteniendo 0,02 % (v/v) de colorante azul, que permite el seguimiento de las muestras mientras se realiza la electroforesis. El volumen final de reacción fue de 23 μ l, hasta el que se completó con H₂O ultrapura. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min.

Las muestras se cargaron en un gel preparado 20 min antes de su uso, al 5,5 % de poliacrilamida (9,2 ml 30:1 poliacrilamida:bisacrilamida, 1,25 ml tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X, 39,3 ml H₂O ultrapura, 260 μ l persulfato de amonio al 25 % en H₂O y por último 20 μ l TEMED; volumen final de 50 ml). Como controles positivos se emplearon muestras de extractos nucleares de bazo. La electroforesis se realizó en TBE al 0,25 %. El gel se corrió a un voltaje constante de 100 V durante 3-3,5 h. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron deshidratados y expuestos al Photoimager. Las bandas se analizaron mediante el programa informático ImageQuant.

3.2.1.2.8. Estudio de la apoptosis en leucocitos peritoneales.

Los ensayos de apoptosis se llevaron a cabo según una modificación de la técnica descrita por Wirleitner et al. (1998), empleando como método de detección la sonda fluorescente JC-1 (Molecular Probes).

El JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil benzimidazolil carbocianina yoduro) es un colorante catiónico que se acumula en la mitocondria de forma dependiente del potencial de membrana. Así, es capaz de detectar la despolarización de la membrana mitocondrial, evento que tiene lugar en los procesos de apoptosis, aumentando la intensidad de fluorescencia de la sonda a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm.

Alícuotas de 100 μ l de la suspensión peritoneal ajustada a 10⁶ células/ml se dispensaron en una placa negra de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 10 μ l de H₂O₂ (50 μ M en pocillo) para inducir apoptosis, y el mismo volumen de PBS en los pocillos control. De cada muestra, se incluyó también un pocillo sólo con muestra (sin estímulo ni sonda) para conocer el valor de la autofluorescencia y corregirlo del valor final. Se incubó la placa durante 6 h a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y humedad a saturación. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 10 μ l de la sonda JC-1 (10 μ g/ml en pocillo) a los pocillos control y estimulados y se incubó la placa 30 min más. Finalmente, se obtuvo la medida de

fluorescencia en el fluorímetro de placas a una longitud de onda de excitación de 485nm y de emisión de 530nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como % respecto al control.

3.2.1.2.9. Estudio de la morfología cerebral.

La morfología cerebral fue estudiada mediante Imágenes por Resonancia Magnética, que fueron realizadas en el Centro de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense. Los animales fueron anestesiados con anestesia volátil consistente en una mezcla de isoflurano y oxígeno, y sus constantes fueron monitorizadas durante el transcurso de la prueba. Los animales anestesiados se dispusieron en el centro de un Biospec 47/40 (Bruker), operando a 4,7 Tesla (200 MHz), y la cabeza se apoyó siempre en la misma localización para asegurar un posicionamiento reproducible entre ensayos.

El aparato se encuentra equipado con un gradiente de 12 cm y es capaz de alcanzar amplitud de gradientes de hasta 200 mTesla/m a lo largo de todos los ejes. Se adquirieron 12 cortes coronales contiguos en T2 (tiempo que tarda la magnetización transversal en descender en un 63% de su fuerza máxima o, lo que es igual, persiste un 37%), y las condiciones de adquisición fueron similares para todos los animales. Los ajustes de las imágenes fueron muy reproducibles, conduciendo a los mismos valores de amplitud de pulso de radiofrecuencia. El único parámetro que se permitió variar deliberadamente fue la ganancia receptora, determinada automáticamente al inicio de la adquisición. Las imágenes se reconstruyeron en el ordenador del espectrómetro. Una vez corregidas las diferencias de ganancia, las imágenes de diferentes animales se pueden comparar directamente.

En los cortes adecuados de las imágenes obtenidas, se cuantificó la intensidad en escala de grises de la señal ponderada en T2, con supresión de grasa, en distintas áreas cerebrales de especial relevancia por las funciones que coordinan; corteza cingular, amígdala, hipocampo, corteza entorrinal, corteza somatosensorial, y corteza motora. Se empleó un atlas cerebral de ratón para el reconocimiento de estas regiones, y plantillas adecuadas para cada uno de los cortes empleados (Fig. 11).

Además, el líquido cefalorraquídeo, cuyo aumento se relaciona con atrofia, se reconoció por su alta intensidad de señal (zonas brillantes), que se debe a su T2 largo.

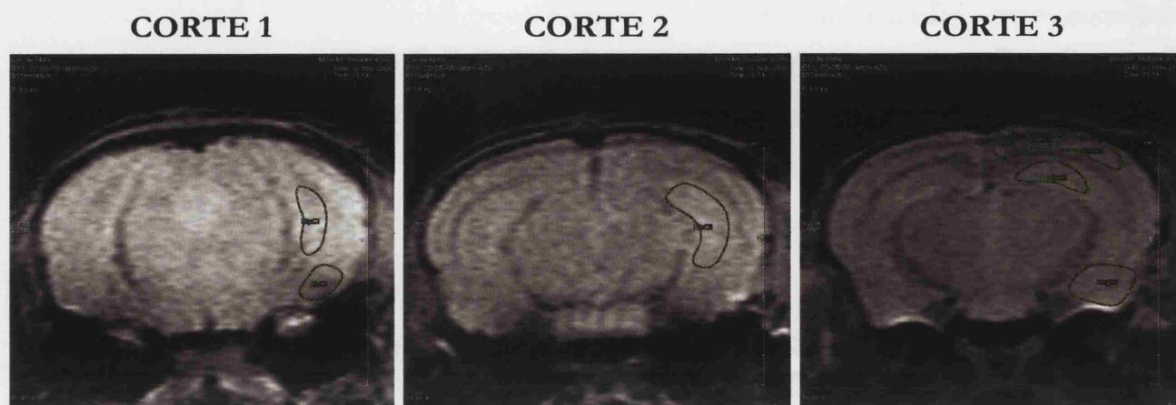


Figura 11. Plantillas empleadas en la determinación de la señal en T2 para cada una de las regiones cerebrales de interés. CORTE (C) 1: Hipocampo (Hip) C1; Corteza entorrinal C1; CORTE 2: HipC2; CORTE 3: Corteza cingular C3; Corteza Motora C3; Corteza somatosensorial C3; HipC3; Amígdala C3.

3.2.1.2.10. Profundización en el estrés oxidativo a nivel de proteínas y lípidos en los sistemas inmunitario y nervioso.

De las principales clases de macromoléculas biológicas: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono, que son susceptibles al ataque oxidativo consecuencia de la vida aeróbica, en la presente tesis se han estudiado proteínas y lípidos, cuya modificaciones oxidativas suelen alterar la función que desempeñan en la célula, poniendo en riesgo la homeostasis celular.

Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas pueden oxidarse, glicoxidarse y lipoxidarse. En nuestro caso, empleamos los marcadores: malondialdehído-lisina (MDAL), como representante de la lipoxidación proteica; carboximetil-lisina (CML), con origen mixto en la peroxidación lipídica y en la glicoxidación; carboxietil-lisina (CEL), procedente principalmente de la oxidación de carbohidratos; y semiadehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoalifático (AASA), que son los principales carbonilos proteicos, formados por oxidación directa de los residuos arginina el primero y de lisina el segundo.

1) Cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS)

Preparación de las muestras

Las muestras de bazo y cerebro se homogeneizaron en tampón HEPES 10 mM, pH 1,4, suplementado con BHT 1 μ M, DETAPAC 1 mM y ácido fítico 1 mM, como antioxidantes. Así mismo, se añadieron inhibidores de la proteólisis, tales como leupeptina (0,5 μ g/ml), aprotinina (0,5 μ g/ml), pepstatina (0,7 μ g/ml), PMSF (40 μ g/ml) y EDTA (1,1 mM). A continuación, se procedió a la extracción con cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) según Folch et al. (1957). Una vez eliminada la fase clorofórmica, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10 % (concentración en la mezcla de precipitación), acelerando la precipitación mediante centrifugación. Posteriormente, se redujeron las muestras incubándolas toda la noche con 1 ml de NaBH₄ (500 mM) disuelto en un tampón de ácido bórico (0,2 M, pH 9,2). A esta disolución se le añadió una gota de hexanol como agente antiespumante. Las proteínas se precipitaron de nuevo añadiendo 1 ml de ácido tricloroacético al 10% para, seguidamente, centrifugarlas otra vez. Este último paso se repitió dos veces.

Síntesis de los estándares internos

Para la síntesis de los diferentes estándares internos (deuterados y no deuterados), se utilizaron procedimientos descritos previamente.

Así, la N^ε-(carboximetil)-lisina (CML) y la [²H₄]-CML se sintetizaron a partir de la reacción del ácido glioxílico con N^ε-acetil-lisina y [²H₄]-lisina, respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico. La CML se aisló mediante cromatografía de intercambio iónico, comprobándose su estructura y homogeneidad por GC/MS y por análisis de aminoácidos (Knecht et al., 1991).

La N^ε-(carboxietil)-lisina (CEL) y la [²H₄]-CEL se sintetizaron mediante la reacción de piruvato con formil-lisina y [²H₄]-lisina, respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico (relación molar 1:1:3) en tampón fosfato 0,2 M a pH 7,4 y 37 °C durante 3 días (Ahmed et al., 1997).

Para la síntesis de N^ε-(malondialdehído)-lisina (MDAL) y [²H₄]-MDAL fue necesario obtener previamente malondialdehído (MDA). Este se produjo inmediatamente antes de su uso por hidrólisis de su forma dimetilacetal añadiéndole HCl (1M) durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se cuantificó midiendo la absorbancia a 245 nm, y utilizando su coeficiente de extinción molar (137.000 M⁻¹cm⁻¹). Para obtener MDAL o

[$^2\text{H}_4$]-MDAL, se incubó lisina o [$^2\text{H}_4$]-lisina con una cantidad equimolecular de MDA en presencia de cianoborohidruro sódico en exceso (8 veces la cantidad de lisina o [$^2\text{H}_4$]-lisina) en tampón fosfato (0,2 M, pH 7,4 y 37 °C) durante toda la noche (Requena et al., 1997).

Los carbonilos proteicos específicos semiadehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoadípico (AASA) se obtuvieron mediante el método descrito por Requena et al. (2001).

El ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico (HAVA), producto de la reducción del GSA, se obtuvo de la purificación del éster del ácido 5-metilglutámico en una columna de intercambio iónico Dowex-50W seguido de precipitación con metanol. Para la preparación de d5-HAVA se utilizaron 100 mg de ácido d5-2,3,3,4,4-L-glutámico 98%, que se convirtió en el correspondiente éster metílico mediante el tratamiento con ácido metanólico-HCl. Tras la evaporación, el producto se trató como se describe para la preparación del HACA.

El ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico (HACA), producto de la reducción del AASA, se precipitó con metanol. El d4-AASA se preparó partiendo de 250 mg de D-L-lisina-4,4,5,5-d4 · 2HCl 98% que se convirtieron a N- α -formil-d4-lisina. El producto se evaporó y se disolvió en 20 ml de agua. Tras ajustar el pH a 9,5 con NH_4OH , se añadieron 320 mg de nitroprusiato sódico durante 20 min, mientras se calentaba a 60 °C y se ajustaba el pH cuando era necesario. La solución resultante se calentó durante 4 h más, ajustando nuevamente el pH. El producto de la reacción se filtró e hidrolizó con HCl (6 M) durante 1 h a 100 °C. Después de la evaporación, el producto se disolvió en ácido fórmico (pH 2) y se filtró en una columna de intercambio iónico Dowex-50W. El producto final se precipitó con un pequeño volumen de metanol caliente.

Las preparaciones de HAVA, d5-HAVA, ASSA y d4-GSA se disolvieron en agua desionizada y se calibraron con una mezcla de aminoácidos.

Las muestras y los estándares se analizaron por HPLC en un sistema Hewlett-Packard Serie 110, después de su derivación automática con ortoftaladehído. El área media de Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Met y Val se utilizó para calcular la concentración de HAVA, d5-HAVA, HACA o d4-HACA en cada preparación. Los análisis se realizaron por triplicado para cada solución, y se congelaron alícuotas a -70° C para su posterior utilización (Requena et al., 2001).

Análisis de CML, CEL, MDAL, GSA y AASA

Las concentraciones de CML, CEL, MDAL, GSA y AASA se determinaron por GC/MS según Pamplona et al. (1999; 2000). A las muestras reducidas se les añadieron los estándares internos deuterados marcados isotópicamente: d8-lisina (120 nmol), d4-CML (474 pmol), d4-CEL (432 pmol), d8-MDAL (216 pmol), d5-GSA (648 pmol) y d4-AASA (140 pmol). Las muestras se sometieron a hidrólisis añadiendo 1ml de HCl (6 N) e incubando a 155 °C durante 30 min. Los hidrolizados obtenidos se rehidrataron en 1ml de ácido trifluoroacético al 1% y se aplicaron a columnas de extracción en fase sólida C-18 de 1ml (Supelco), equilibradas previamente con el mismo solvente. Se recogió el primer ml eluido y los 2 ml adicionales de ácido trifluoroacético al 1%, para, posteriormente, secarse al vacío.

Los derivados N,O-trifluoroacetyl de los ésteres metílicos del hidrolizado de proteínas se obtuvieron de la siguiente manera: primero se incubó la muestra en 1 ml de metanol:HCl al 5% durante 30 min a 65 °C seguido de evaporación bajo flujo de nitrógeno para obtener los ésteres metílicos; posteriormente se incubaron los ésteres metílicos del hidrolizado con 1 ml de ácido trifluoroacético anhidro durante 60 min a temperatura ambiente para obtener los derivados trifluoroacetyl. A continuación, el agente derivatizador se evaporó bajo flujo de nitrógeno para, por último, redissolver las muestras en 100 µl de cloruro de metileno. Se centrifugó a 800 g durante 5 min para eliminar los posibles precipitados. Los sobrenadantes se traspasaron a viales y se inyectaron alícuotas de 2 µl en el sistema de GC/MS para su análisis y cuantificación.

Cromatografía de gases / espectrometría de masas

Los análisis GC/MS se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con una columna capilar de 30 m HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5973a en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 275 °C y el programa de temperaturas fue el siguiente: 5 min a 110 °C, incremento de 2 °C/min hasta 150 °C, aumento de 5 °C/min hasta 240° C, incremento de 25 °C/min hasta 300° C, y al final se mantuvo la temperatura a 300 °C durante 5 min. Para la cuantificación se utilizaron curvas patrón construidas a partir de la mezcla de estándares deuterados y no deuterados.

Los análisis se realizaron mediante monitorización de iones específicos seleccionados previamente (SIM). Los analitos se detectaron por SIM - GC/MS. Los iones

usados fueron lisina (m/z, 180) y d8-lisina (m/z, 187); GSA (m/z, 280) y d5-GSA (m/z, 285); AASA (m/z, 294) y d4-ASSA (m/z, 298); CML (m/z, 392) y d4-CML (m/z, 396); CEL (m/z, 379) y d4-CEL (m/z, 383); y MDAL (m/z, 474) y d8-MDAL (m/z, 482). Las concentraciones finales se expresaron en μmol de GSA, AASA, CML, CEL o MDA-lisina / mol lisina.

2) *Western blot*

Adicionalmente, los valores de MDAL fueron determinados también mediante *western blot* convencional, tanto en cerebro como en bazo, empleando un anticuerpo primario monoclonal conjugado con la enzima HRP (Academy Bio-Medical Company) a una concentración 1:1000.

Además, CML fue analizada en ganglios axilares y corazón, también mediante *western blot*. La concentración del anticuerpo monoclonal utilizado en este caso (Biologo) fue de 1:500. Para la detección posterior de la unión del anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario frente a ratón conjugado con HRP (1:5000, Amersham).

Como control se utilizó un anticuerpo anti- β actina (1:5000, Abcam), para referir la cantidad total de MDAL o de CML frente al contenido proteico total, representado por la cantidad de β actina.

Se empleó un sustrato quimioluminiscente de la HRP (Millipore), para la detección del anticuerpo primario. La cuantificación y grabación de la señal fue realizada con un equipo ChemiDoc de BioRad. La concentración proteica se determinó por el método de BCA. Los datos se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado.

Dado que no todas las proteínas son igualmente susceptibles a la oxidación, se planteó también conocer cuáles de ellas presentaban el marcador CML. Para ello, se realizó una electroforesis en dos dimensiones, aumentando la proteína cargada hasta 50 μg , siguiendo cuidadosamente el protocolo proporcionado por la casa comercial (2D PAGE, BioRad). A pesar de que se emplearon anticuerpos secundarios conjugados directamente con fluoróforo para aumentar la sensibilidad, no fue posible la detección del anticuerpo primario. No obstante, en los resultados se muestran las tinciones de plata (Invitrogen) de los geles en dos dimensiones, donde pueden observarse los cambios en las cantidades relativas de proteínas entre grupos experimentales.

Análisis de la composición de los ácidos grasos procedentes de lípidos totales

La susceptibilidad inherente de las macromoléculas al daño oxidativo, asociada a su composición química, es un sistema defensivo frente al envejecimiento. Así, los ácidos grasos altamente insaturados de las membranas celulares son las macromoléculas más susceptibles al daño oxidativo en las células, sensibilidad que se incrementa en función del número de dobles enlaces. Por tanto, en la presente tesis se ha analizado la composición de ácidos grasos procedentes de lípidos totales.

Extracción de los lípidos

Los lípidos se extrajeron de las muestras utilizando cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) en presencia de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,01%, según Folch et al. (1957). Posteriormente se separó la fase orgánica y se evaporó bajo un flujo de nitrógeno en un evaporador N-evap Model 111. La fase lipídica se sometió a un proceso de transesterificación mediante incubación con 2,5 ml de metanol-HCl al 5% durante 90 min a 75 °C. La solución metanol-HCl se preparó mediante la adición de 1,3 ml de cloruro de acetilo a 18,7 ml de metanol, con el objeto de producir HCl anhidro. De este modo se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La extracción de estos ésteres metílicos se efectuó añadiendo 2,5 ml de n-pentano y 1 ml de solución saturada de NaCl, agitando durante 15-30 min en un vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384 y centrifugando a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C. La fase de n-pentano se separó y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. Por último, los ésteres metílicos se disolvieron en 75 µl de disulfuro de carbono (CS₂) como vehículo para su posterior análisis mediante GC/MS.

Condiciones cromatográficas

La separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se llevó a cabo en una columna SP2330 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Serie II. Como detector se utilizó un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973A en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 220° C y el detector a 250° C; el programa de temperatura consistió en 100 °C durante 2 min, subida de temperatura a 10 °C/min hasta los 200 °C, 5 °C/min hasta los 240 °C y, por último, la temperatura se mantuvo 10 min a 240 °C. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por comparación con los correspondientes estándares. Los resultados se expresan como % mol.

Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica

Los diferentes índices se calcularon de la forma que se detalla a continuación:

Contenido de Ácidos Grasos Saturados (**SFA**, del inglés: *Saturated Fatty Acids*):

$$\text{SFA} = [\Sigma\% \text{mol} (8:0 + 10:0 + 11:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 + 24:0)]$$

Contenido de Ácidos Grasos Insaturados (**UFA**, del inglés: *Unsaturated Fatty Acids*):

$$\text{UFA} = [\Sigma\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:1 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6)]$$

Contenido de Ácidos Grasos Monoinsaturados (**MUFA**, del inglés: *Monounsaturated Fatty Acids*):

$$\text{MUFA} = [\Sigma\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 20:1 + 24:1)]$$

Contenido de Ácidos Grasos Insaturados (**PUFA**, del inglés: *Polyunsaturated Fatty Acids*):

$$\text{PUFA} = [\Sigma\% \text{mol} (18:2 + 18:3 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:5 + 22:6)]$$

Contenido de Ácidos Grasos Poliinsaturados de la serie omega 3 (**PUFA(n-3)**):

$$\text{PUFA(n-3)} = [\Sigma\% \text{mol} (18:3 + 20:5 + 22:5^1 + 22:6)]$$

Contenido de Ácidos Grasos Poliinsaturados de la serie omega 6 (**PUFA(n-6)**):

$$\text{PUFA(n-6)} = [\Sigma\% \text{mol} (18:2 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 22:4 + 22:5^1)]$$

Longitud Media de la Cadena (**ACL**, del inglés: *Average Chain Length*):

$$\text{ACL} = [(\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_8 \times 8) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{10} \times 10) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{11} \times 11) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{12} \times 12) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{13} \times 12) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{14} \times 14) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{15} \times 15) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{16} \times 16) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{17} \times 17) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{18} \times 18) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{20} \times 20) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{22} \times 22) + (\Sigma \text{mol } \% \text{totalC}_{24} \times 24)] / 100$$

Índice de Dobles Enlaces (**DBI**, del inglés: *Double Bound Index*):

$$\text{DBI} = [(1 \times \Sigma\% \text{ácidos monoenoicos}) + (2 \times \Sigma\% \text{ácidos dienoicos}) + (3 \times \Sigma\% \text{ácidos trienoicos}) + (4 \times \Sigma\% \text{ácidos tetraenoicos}) + (5 \times \Sigma\% \text{ácidos pentaenoicos}) + (6 \times \Sigma\% \text{ácidos hexaenoicos})]$$

Índice de Peroxidizabilidad Lipídica (**PI**, del inglés: *Peroxidizability Index*):

$$\text{PI} = [(0,025 \times \Sigma\% \text{ácidos monoenoicos}) + (1 \times \Sigma\% \text{ácidos dienoicos}) + (2 \times \Sigma\% \text{ácidos trienoicos}) + (4 \times \Sigma\% \text{ácidos tetraenoicos}) + (6 \times \Sigma\% \text{ácidos pentaenoicos}) + (8 \times \Sigma\% \text{ácidos hexaenoicos})]$$

¹ A la hora de calcular el % de ácidos grasos pertenecientes a cada una de las series: omega 3 y omega 6, se tienen en cuenta solamente los que pertenecen a cada una de ellas, es decir para la serie omega 3 se contabilizará el 22:5n-3 y para la serie omega 6 se contabilizará el 22:5n-6.

Mecanismo de eliminación del daño oxidativo a proteínas: Análisis de la actividad del proteasoma 20S

En la acumulación de daño oxidativo a proteínas podría contribuir una disminución en la tasa de renovación de las mismas con la edad, siendo el proteasoma 20S el complejo preferentemente encargado de reconocer y degradar activamente estos productos.

El método más frecuente para la determinación de la actividad proteasómica se basa en la ruptura por parte del mismo, de péptidos específicos unidos a un fluoróforo, de modo que éste queda liberado y puede ser detectado. Para su estudio, empleamos órganos (ganglios axilares, corazón, pulmón, riñón, hígado) y células inmunitarias peritoneales. Los homogenizados de órganos fueron realizados directamente en tampón de lisis. Las células fueron lavadas y el tampón de lisis se añadió al pellet celular. Este tampón consistió en NaCl 50 mM, HEPES 10 mM pH 8, Sucrosa 500 mM, EDTA 1 mM y Triton X100 0,2 %, al que se adicionó inmediatamente antes de su uso, PMSF 0,2 mM y β -mercaptoetanol 7,2 mM. El proteasoma 20S no necesita de la adición de ATP para su funcionamiento. Las muestras se incubaron 15 min a 4 °C, tras lo cual se realizó una centrifugación a 15000 g de 30 min y a 4 °C. Se tomó una alícuota para la determinación de la cantidad de proteína, mediante el test BCA. Inmediatamente después, se procedió a realizar el ensayo de la actividad proteasómica.

Los péptidos específicos empleados para la medida de las actividades proteasómicas fueron Suc-LLVY y Z-LLE, para las actividades quimiotripsina y caspasa, respectivamente. Ambos se encuentran unidos al fluoróforo amido-4-metilcumarina (AMC). No medimos la actividad tripsina debido a la alta contaminación que se produce como consecuencia de la ruptura de los sustratos a causa de actividades no mediadas por el proteasoma. En placa de 96 pocillos de fondo plano se añadieron el sustrato, Suc-LLVY o Z-LLE a una concentración final de 25 μ M o 150 μ M, respectivamente, y la cantidad adecuada de proteína, que fue diferente para cada tipo de muestra biológica empleada y es necesario ajustar previamente a la realización del ensayo (de modo que la cinética de actividad proteasómica sea lineal y no llegue a la saturación en el transcurso del ensayo), en un volumen final de 200 μ l en HEPES 1 M pH 8. En nuestro caso, la cantidad de proteína empleada fue 60 μ g en corazón, 20 μ g del lisado de hígado, en el caso de los ganglios axilares y también para los leucocitos peritoneales, 10 μ g para el pulmón y 2 μ g en el riñón. Todas las medidas se realizaron por triplicado, y las muestras que pretendían compararse se realizaron en el mismo ensayo. Para cada individuo y actividad proteasómica se realizó su

propio control negativo, por duplicado, que llevaba los mismos componentes y además un inhibidor específico de la actividad proteasómica (MG132 a concentración final de 400 μ M).

La lectura se realizó en un lector de placas con un filtro de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm. La placa se incubó dentro del fluorímetro durante 50 min, a lo largo de los cuales se realizaron 25 ciclos de lectura, 1 ciclo cada 120 segundos. La actividad en presencia de MG132 se restó a la actividad en ausencia del mismo para la obtención de la actividad específica (unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF). Los resultados se expresaron como actividad específica/mg proteína.

3.2.1.2.11. Estudio de la función endocrina. Niveles plasmáticos de corticosterona.

Los plasmas destinados a la valoración de los niveles de corticosterona fueron mantenidos a -20 °C. Antes de la realización del ensayo fueron descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000 g para la eliminación de posibles impurezas.

La corticosterona es el esteroide circulante más abundante en roedores y el glucocorticoide principal secretado por la corteza adrenal en estos animales, que no son capaces de sintetizar cortisol porque carecen de la enzima C-17 hidroxilasa. No obstante, al igual que el cortisol en humanos y la mayoría de mamíferos, la síntesis y liberación de corticosterona en roedores se encuentra controlada por la hormona ACTH a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, existiendo variaciones en función de factores como el sexo y el ciclo diurno, y sus niveles son indicadores de estrés.

La detección de los niveles de corticosterona plasmáticos se realizó mediante un radioinmunoensayo (RIA) comercial (Siemens). Brevemente, el ensayo consistió en un RIA de fase sólida, en el cual la corticosterona murina marcada con 125 I compete durante un tiempo determinado (2 h de incubación a temperatura ambiente) con la corticosterona de la muestra por su unión al anticuerpo, de manera que en la lectura posterior, mayor cantidad de radiactividad supone menor corticosterona presente en la muestra. Los anticuerpos se encuentran inmovilizados a la pared de tubos de polipropileno, por lo que esta competición finaliza simplemente decantando los sobrenadantes de los tubos, permitiendo el aislamiento de la fracción de anticuerpo unida a la corticosterona marcada con radiactividad. Se realizó la lectura de la radiactividad en un contador gamma, y los resultados se expresaron en ng/ml con la ayuda de una curva realizada con concentraciones conocidas de

corticosterona marcada, en que las cpm se enfrentaron al logaritmo de la concentración. La sensibilidad del método es de aproximadamente 5,7 ng/ml. El coeficiente de variación intra- e inter-ensayo depende de la concentración valorada, y es de aproximadamente 4,3 % y 5,8 %, respectivamente.

3.2.1.2.12. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada una de las diferentes pruebas. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Cuando eran sólo dos los grupos a comparar, el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la “t” de Student para muestras independientes.

En los diseños experimentales en que existían más de dos grupos a comparar, se comprobó además la homogeneidad de las varianzas entre los grupos a través del test de Levene, para el posterior análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey para las comparaciones post hoc, en el caso de varianzas homogéneas, o de Games-Howell, en caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad. Los ANOVAs fueron de una, dos o tres vías, dependiendo de las variables dependientes consideradas en cada diseño experimental. Así, por ejemplo, se realizaron ANOVAs de una vía para ver el efecto de la edad, de dos vías para el estudio del efecto de la edad y el tratamiento, la edad y el sexo, o la transgenicidad y el sexo, y de tres vías para el análisis de la transgenicidad, el sexo y el tratamiento.

El estudio de la longevidad, a través de la esperanza de vida media, se realizó mediante el test de Kaplan-Meier.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa.

3.2.2. Humanos.

3.2.2.1. Protocolos experimentales en humanos.

3.2.2.1.1. Estudio del efecto de la ansiedad crónica y de la situación de estrés psicosocial por ausencia de hogar como modelos de envejecimiento prematuro en humanos.

Parámetros en estudio

En este estudio, que se ha subdividido en los dos protocolos experimentales que posteriormente se indican, se llevó a cabo la valoración de los parámetros que seguidamente se relacionan: En neutrófilos de sangre periférica; la adherencia, la quimiotaxis, la fagocitosis, y los niveles de anión superóxido. En linfocitos de esa misma localización; la adherencia, la quimiotaxis, la proliferación inducida por PHA, y la actividad NK. También se analizaron los niveles de IL-2 (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos inducidos por PHA), y de TNF- α (en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS). Además, se determinaron los niveles plasmáticos de antioxidantes totales y de cortisol.

1) Estudio de la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y de los niveles plasmáticos de antioxidantes y de cortisol en mujeres ansiosas

Participantes

El estudio fue realizado en 33 mujeres de $43,29 \pm 2,09$ años de edad, que mostraron niveles altos de ansiedad ($53,8 \pm 1,24$ en escala de 0 a 63; $P < 0,001$ con respecto al grupo control) en el Inventario de Ansiedad de Beck (Beck et al, 1988; Beck, 1993; Comeche et al., 1995), que se recoge más adelante. El grupo control se compuso por 33 mujeres no ansiosas ($4,32 \pm 0,60$) de la misma edad, con objeto de evitar diferencias debidas a estos factores.

Todas las mujeres eran españolas de raza caucásica, que fueron reclutadas de la población de Madrid a través de carteles, correos electrónicos y anuncios en prensa. Los criterios de inclusión fueron: (1) ser mujer de 30 a 50 años de edad, (2) mostrar niveles

altos o ausencia de ansiedad. Ninguna de las participantes se encontraba recibiendo ningún tipo de tratamiento psicofarmacológico ni psicoterapia.

Los criterios de exclusión consistieron en malnutrición, embarazo, alergias graves, inmunodeficiencias o enfermedades autoinmunes, neoplasia, fiebre reumática, diabetes, convulsiones, desórdenes endocrinos, anemia, radioterapia, quimioterapia, toma de corticosteroides adrenales o terapia de reemplazo estrogénico, ser fumadora o consumidora de alcohol o drogas, y haber realizado entrenamiento de resistencia poco antes de su admisión. También fueron excluidas del estudio las mujeres que habían sido recientemente diagnosticadas como pacientes de enfermedades infecciosas, habían sufrido algún tratamiento quirúrgico, consumían medicamentos inmunomoduladores, mostraron resultados de laboratorio patológicos, o eran incapaces de completar el protocolo de evaluación o de hablar, leer o escribir en lengua castellana. Considerando el hecho de que el momento del ciclo menstrual puede ejercer una fuerte influencia sobre la inmunidad, las participantes no se encontraban ni ovulando ni menstruando en el momento del estudio. Antes de la realización del cuestionario psicológico, se llevó a cabo una entrevista clínica estructurada. Las mujeres que mostraron síntomas depresivos fueron excluidas del estudio. Estas evaluaciones fueron realizadas por el Dr. León Siboni en su consulta médica privada localizada en Madrid.

Con respecto a las características sociodemográficas de la muestra, todas las mujeres habían completado al menos la educación escolar básica (≥ 12 años de formación) y pertenecían a la clase económica media-alta.

Todas las participantes recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación biomédica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Las muestras sanguíneas (9 ml de sangre periférica tomados por punción venosa) se recogieron de 9.00 a 10.00 h (en tubos con citrato), con objeto de controlar el efecto de las variaciones circadianas en los parámetros inmunológicos, siempre después de la realización del cuestionario psicológico (versión española), que se adjunta.

Instrumento

Para la determinación de los niveles de ansiedad se empleó el *Inventario de Ansiedad de Beck* (BAI). El dominio del BAI es la ansiedad, sobre todo en sus aspectos físicos:

INVENTARIO DE ANSIEDAD DE BECK (BAI)

Nombre _____ Fecha _____ ID: _____

Por favor, indique para cada uno de los siguientes síntomas de ansiedad, el grado en que se ha visto afectado por cada uno de ellos DURANTE LA ÚLTIMA SEMANA y en el momento actual. Para ello debe elegir de entre las siguientes respuestas la que mejor corresponda con la intensidad de cada uno de sus síntomas:

- | |
|--|
| 0 En absoluto
1 Levemente, no me molesta mucho.
2 Moderadamente, fue muy desagradable pero podía soportarlo.
3 Severamente, casi no podía soportarlo. |
|--|

1. Hormigueo o entumecimiento	0	1	2	3
2. Sensación de calor.	0	1	2	3
3. Temblor de piernas.	0	1	2	3
4. Incapacidad para relajarse.	0	1	2	3
5. Miedo a que suceda lo peor.	0	1	2	3
6. Mareo o aturdimiento.	0	1	2	3
7. Palpitaciones o taquicardia.	0	1	2	3
8. Sensación de inestabilidad o inseguridad física.	0	1	2	3
9. Terrores.	0	1	2	3
10. Nerviosismo.	0	1	2	3
11. Sensación de ahogo.	0	1	2	3
12. Temblores de manos.	0	1	2	3
13. Temblor generalizado o estremecimiento.	0	1	2	3
14. Miedo a perder el control.	0	1	2	3
15. Dificultad para respirar.	0	1	2	3
16. Miedo a morir.	0	1	2	3
17. Sobresaltos.	0	1	2	3
18. Molestias digestivas o abdominales.	0	1	2	3
19. Palidez.	0	1	2	3
20. Rubor facial.	0	1	2	3
21. Sudoración (no debida a calor).	0	1	2	3

nerviosismo, incapacidad para relajarse, jaquecas, taquicardias (Beck et al, 1988; Beck, 1993; Comeche et al., 1995). Se trata de un instrumento auto-aplicado que tiene como objetivo discriminar entre ansiedad y depresión. Fue específicamente diseñado para diferenciar los síntomas comportamentales, emocionales y psicológicos entre individuos con ansiedad o con depresión. Para ello, los autores incorporaron ítems que son específicos a los síntomas psicológicos y cognitivos del trastorno de ansiedad, e independientes de los síntomas de la depresión. Además, distingue los sujetos ansiosos de los no ansiosos, pero no puede considerarse una medida específica de la ansiedad generalizada, dado que no discrimina bien entre trastornos de ansiedad ni distingue éstos de la depresión ansiosa. No discrimina específicamente entre la ansiedad rasgo y la ansiedad estado, sin embargo, su alta fiabilidad *test-retest* sugiere que funciona como medida de rasgo.

Las mujeres informaron acerca de cuánto habían sufrido cada uno de los síntomas durante la semana anterior, incluyendo el día en que se administró el instrumento. Está compuesto por 21 ítems valorados en una escala tipo Likert de 0 (nada en absoluto) hasta 3 (severamente). Para obtener la puntuación global, cuyo rango oscila entre 0 y 63, se sumaron las puntuaciones obtenidas en cada ítem, siendo los puntos de corte los siguientes: de 0 a 9: normal o ausencia de ansiedad; de 10 a 18: ansiedad baja a moderada; de 19 a 29: ansiedad moderada a alta; de 30 a 63: ansiedad alta. El tiempo de administración fue de 5 min.

Criterios de calidad del BAI:

Fiabilidad: Consistencia interna según α de Cronbach: 0,90-0,94; correlación ítem-total: 0,30-0,71; fiabilidad *test-retest* r: 0,67-0,93.

Validez: Correlaciones del Inventario de Ansiedad de Beck con la Escala para la Valoración de la Ansiedad de Hamilton (HARS): 0,51; con el Inventario de Ansiedad Rasgo-Estado (STAI): 0,47-0,58; con la subescala de ansiedad del Cuestionario de 90 Síntomas Revisado (SCL-90-R): 0,81; con el Inventario de Depresión de Beck (BDI): 0,61; y con la subescala de depresión del SCL-90-R: 0,62.

2) Estudio del efecto de la situación de estrés psicosocial en personas sin hogar sobre la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y sobre los niveles plasmáticos de antioxidantes y de cortisol

La ciudad de Madrid, en el momento de la realización del estudio (2004), tiene aproximadamente una población de 4×10^6 habitantes. En ella y en un periodo de un año, entre 5000 y 7000 personas son o bien literalmente sin techo y / o se encuentran utilizando servicios sociales para los sin techo.

Participantes

El estudio se realizó en 80 personas de edades comprendidas entre los 18 y los 67 años. La muestra se compuso de un grupo experimental formado por 40 personas sin techo y un grupo de comparación de 40 personas del mismo sexo y edad que vivían hospedados en casas (controles).

La muestra de los sin hogar fue reclutada de un centro de día / comedor de beneficencia para personas sin techo (Programa Integral San Vicente de Paúl, Paseo del General Martínez Campos, Madrid), al que acudían a diario aproximadamente 400 personas en el momento en que se llevó a cabo el estudio. Los criterios de inclusión fueron: (1) ser usuario del citado centro en el momento del estudio, (2) ser mayor de edad (≥ 18 años). Los criterios de exclusión fueron: (1) diagnóstico psiquiátrico previo de esquizofrenia, psicosis o demencia, (2) diagnóstico previo de infección por VIH o ser adicto al alcohol o a las drogas, (3) incapacidad para completar el protocolo de evaluación, (4) uso de medicación que pudiera interferir con los resultados inmunológicos, y (5) incapacidad para hablar, leer o escribir en lengua castellana.

Se seleccionaron aleatoriamente 90 individuos de la lista completa de usuarios del centro de día (360 usuarios), mediante un procedimiento sistemático de muestreo aleatorio. 32 usuarios se encontraban desaparecidos en el momento del estudio. Del total de 58 personas contactadas, 6 fueron excluidas por el criterio de exclusión (1) anteriormente citado, y 12 rechazaron participar. De los 40 participantes incluidos finalmente, 28 (70 %) eran hombres y 12 (30 %) mujeres. La media de edad fue 43 años. La mayor parte de los sujetos tenían alguna educación escolar ($n=39$, 98,5 %). La mayoría de participantes ($n=31$, 72 %) habían padecido la falta de hogar durante una media de $5,28 \pm 1,07$ meses. En este estudio, se definió a las personas sin techo como aquellas que vivían en la calle, en centros

de acogida temporales y hostales para personas sin hogar, en instituciones, o temporalmente con familiares o amigos debido a la falta de hospedaje. El resto de participantes que formó parte de este grupo ($n=9$, 28 %) eran individuos hospedados inadecuadamente (personas que vivían con hospedaje próximo a los estándares mínimos). Todos los participantes habían sufrido una amplia variedad de sucesos vitales estresantes, como desempleo, muerte de familiares, problemas de salud, violencia, etc.

Con respecto a la percepción de su estado de salud actual en el momento del estudio, más de la mitad de la muestra (62,6 %) dijo tener una salud pobre o regular. El 53,1 % informó de algún problema físico, como infecciones respiratorias (17,4 %), Herpes Simplex (13%) y dolores de cabeza, musculares o de huesos (17,4 %).

La mayor parte de los participantes mostraron niveles clínicos de angustia psicológica. La puntuación media en depresión, según el Inventario de Depresión de Beck, fue $18,03 \pm 1,77$, y en ansiedad, según el BAI, fue $17,34 \pm 1,79$. Un total del 75 % y 65,6 % de la muestra mostró niveles clínicos de depresión y ansiedad, respectivamente.

Se evaluaron además 40 voluntarios como grupo control, del mismo sexo y edad que la muestra sin techo. Los participantes pertenecientes a este grupo fueron gente que respondió a anuncios por correo electrónico y carteles. El criterio de inclusión fue: (1) tener una vivienda o espacio adecuado en el que la persona y su familia pudiera desarrollar posesión exclusiva (muestra hospedada). Los criterios de exclusión fueron los mismos que los ya citados para el grupo experimental. Sus puntuaciones medias tanto para depresión ($5,9 \pm 0,85$) como para ansiedad ($9,56 \pm 1,24$) se encontraban al nivel normal de la población general.

Todos los participantes, controles y sin techo, recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron consentimiento escrito para el empleo de sus muestras sanguíneas en investigación biomédica. El consentimiento informado se obtuvo una vez finalizada la entrevista y antes de pedir la donación de sangre a los participantes potenciales. Las muestras de sangre (obtenidas por punción venosa de sangre periférica) fueron recogidas por la mañana en tubos con citrato. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid. Se siguieron los principios de la Declaración de Helsinki. Las entrevistas y cuestionarios fueron llevados a cabo en una habitación en total privacidad por la psicóloga Aída de Vicente.

Instrumentos

Se llevó a cabo una *entrevista estructurada*, que incluía datos acerca de las características sociodemográficas, los sucesos vitales estresantes, factores psicosociales, funcionamiento cognitivo y aspectos de la calidad de vida.

La información sobre los síntomas depresivos y ansiosos se obtuvo empleando los instrumentos apropiados, es decir, el *Inventario de Depresión de Beck* (BDI, Beck et al., 1961, Vázquez y Sanz, 1999) y el *Inventario de Ansiedad de Beck* (Beck et al., 1988; descrito en el estudio anterior), respectivamente, en su versión en lengua castellana.

Los dominios del BDI son las manifestaciones conductuales de la depresión en adolescentes y adultos. Contiene un factor cognitivo-afectivo y un factor somático. Discrimina entre pacientes con trastorno de las personas que no lo tienen (controles), pacientes con distimia de aquéllos con un trastorno depresivo mayor, y pacientes con un trastorno de ansiedad generalizada de aquéllos con un trastorno depresivo mayor. Se trata también de un cuestionario autoaplicado (a pesar de que en una primera versión era administrado por el clínico) de 21 ítems en su versión revisada (BDI-IA) en el año 1978. Estos 21 ítems evalúan un amplio espectro de síntomas depresivos y cada uno se compone de cuatro afirmaciones acerca de la intensidad del síntoma, desde 0 (ausente o leve) hasta 3 (muy intenso). Cubre un marco temporal de una semana. La puntuación total se obtuvo sumando las obtenidas en cada uno de los ítems y se interpretó del siguiente modo: intensidad mínima: 0-9; intensidad leve: 10-16; intensidad moderada: 17-29; alta intensidad: 30-63. El tiempo de aplicación fue de 5 a 10 minutos.

Criterios de calidad del BDI:

Fiabilidad: Existen diversos estudios sobre sus características psicométricas para distintas muestras. En general, la consistencia interna oscila, según α de Cronbach, entre 0,73 y 0,95. Fiabilidad *test-retest* r : 0,81-0,83.

Validez: Correlaciones entre el BDI y otras medidas de la depresión para pacientes psiquiátricos: 0,55-0,96; para personas sin trastorno: 0,55-0,73. Correlaciones con la Escala para la Evaluación de la Depresión de Hamilton (Ham-D) para pacientes psiquiátricos: 0,61-0,86; con la Escala Autoaplicada para la Depresión de Zung (Zung SDS): 0,57-0,86; con la subescala de Depresión del Cuestionario de 90 Síntomas (SCL-90): 0,76; con la subescala de Depresión del Inventario Multifásico de la Personalidad de Minnesota (MMPI-D): 0,60; y con la Escala de Desesperanza de Beck (BHS): 0,60.

INVENTARIO DE DEPRESIÓN DE BECK (BDI)

Nombre _____ Fecha _____ ID: _____

En este cuestionario aparecen varios grupos de afirmaciones sobre estado de ánimo. Por favor, lea con atención cada una. A continuación, señale cuál de las afirmaciones de cada grupo describe mejor cómo se ha sentido DURANTE ESTA ÚLTIMA SEMANA, INCLUIDO EL DÍA DE HOY. Rodee con un círculo el número que está a la izquierda de la afirmación que haya elegido. Si dentro de un grupo, hay más de una afirmación que considere aplicable a su caso, márquela también. Asegúrese de leer todas las afirmaciones dentro de cada grupo antes de realizar la elección.

- | | |
|--|--|
| 1. 0 No me siento triste | 12. 0 No he perdido el interés por los demás |
| 1 Me siento triste | 1 Estoy menos interesado en los demás que antes |
| 2 Me siento triste continuamente y no puedo dejar de estarlo | 2 He perdido la mayor parte de mi interés por los demás |
| 3 Me siento tan triste o tan desgraciado que no puedo soportarlo | 3 He perdido todo el interés por los demás |
| 2. 0 No me siento especialmente desanimado respecto al futuro | 13. 0 Tomo decisiones más o menos como siempre he hecho |
| 1 Me siento desanimado respecto al futuro | 1 Evito tomar decisiones más que antes |
| 2 Siento que no tengo que esperar nada | 2 Tomar decisiones me resulta mucho más difícil que antes |
| 3 Siento que el futuro es desesperanzador y que las cosas no mejorarán | 3 Ya me es imposible tomar decisiones |
| 3. 0 No me siento fracasado | 14. 0 No creo tener peor aspecto que antes |
| 1 Creo que he fracasado más que la mayoría de las personas | 1 Estoy preocupado porque parezca mayor o poco atractivo |
| 2 Cuando miro hacia atrás, sólo veo fracaso tras fracaso | 2 Creo que se han producido cambios permanentes en mi aspecto que me hacen parecer poco atractivo |
| 3 Me siento una persona totalmente fracasada | 3 Creo que tengo un aspecto horrible |
| 4. 0 Las cosas me satisfacen tanto como antes | 15. 0 Trabajo igual que antes |
| 1 No disfruto de las cosas tanto como antes | 1 Me cuesta un esfuerzo extra comenzar a hacer algo |
| 2 Ya no tengo una satisfacción auténtica de las cosas | 2 Tengo que obligarme mucho para hacer todo |
| 3 Estoy insatisfecho o aburrido de todo | 3 No puedo hacer nada en absoluto |
| 5. 0 No me siento especialmente culpable | 16. 0 Duermo tan bien como siempre |
| 1 Me siento culpable en bastantes ocasiones | 1 No duermo tan bien como antes |
| 2 Me siento culpable en la mayoría de las situaciones | 2 Me despierto una o dos horas antes de lo habitual y me resulta difícil volver a dormir |
| 3 Me siento culpable constantemente | 3 Me despierto varias horas antes de lo habitual y no puedo volver a dormir |
| 6. 0 No creo que esté siendo castigado | 17. 0 No me siento más cansado de lo habitual |
| 1 Me siento como si fuese a ser castigado | 1 Me canso más fácilmente que antes |
| 2 Espero ser castigado | 2 Me canso en cuanto hago cualquier cosa |
| 3 Siento que estoy siendo castigado | 3 Estoy tan cansado que no puedo hacer nada |
| 7. 0 No estoy decepcionado de mí mismo | 18. 0 Mi apetito no ha disminuido |
| 1 Estoy descontento conmigo mismo | 1 No tengo tan buen apetito como antes |
| 2 Me avergüenzo de mí mismo | 2 Ahora tengo mucho menos apetito |
| 3 Me detesto | 3 He perdido completamente el apetito |
| 8. 0 No me considero peor que cualquier otro | 19. 0 Últimamente he perdido poco peso o no he perdido nada |
| 1 Me autocritico por mis debilidades o por mis errores | 1 He perdido más de 2 kilos y medio |
| 2 Continúa me culpo por mis faltas | 2 He perdido más de 4 kilos |
| 3 Me culpo por todo lo malo que sucede | 3 He perdido más de 7 kilos |
| 9. 0 No tengo ningún pensamiento de suicidio | 20. 0 No estoy preocupado por mi salud más que lo normal |
| 1 A veces pienso en suicidarme pero no lo cometería | 1 Estoy preocupado por problemas físicos como dolores, molestias, malestar de estómago o estreñimiento |
| 2 Desearía suicidarme | 2 Estoy preocupado por mis problemas físicos y me resulta difícil pensar en algo más |
| 3 Me suicidaría si tuviera la oportunidad | 3 Estoy tan preocupado por mis problemas físicos que soy incapaz de pensar en cualquier otra cosa |
| 10. 0 No lloro más de lo que solía | 21. 0 No he observado ningún cambio reciente en mi interés por el sexo |
| 1 Ahora lloro más que antes | 1 Estoy menos interesado por el sexo que antes |
| 2 Llora continuamente | 2 Ahora estoy mucho menos interesado por el sexo |
| 3 Antes era capaz de llorar, pero ahora no puedo incluso aunque quiera | 3 He perdido totalmente mi interés por el sexo |
| 11. 0 No estoy más irritado de lo normal en mí | |
| 1 Me molesto o irrito más fácilmente que antes | |
| 2 Me siento irritado continuamente | |
| 3 No me irrito absolutamente nada por las cosas que antes solían irritarme | |

3.2.2.1.2. Estudio del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre la funcionalidad y el estrés oxidativo de leucocitos de sangre periférica en mujeres postmenopáusicas.

Parámetros en estudio

Los parámetros analizados en este estudio fueron: En neutrófilos de sangre periférica; la adherencia, la quimiotaxis, la fagocitosis, y los niveles de anión superóxido. En linfocitos; la adherencia, la quimiotaxis, la proliferación inducida por PHA, y la actividad NK. También se estudiaron los niveles de IL-2 (en sobrenadantes de cultivo de linfocitos inducidos por PHA), y de TNF- α e IL-8 (en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS). Además, se valoraron los niveles de GSH en neutrófilos, linfocitos, y en plasma, así como los niveles plasmáticos de MDA.

Participantes

Todas las mujeres participantes eran españolas de raza caucásica e integrantes de la población de Madrid. Los criterios de inclusión en los grupos experimentales del ensayo fueron los que a continuación se detallan: (1) ser mujer postmenopáusica mayor de 59 o de 69 años, (2) gozar de un buen estado de salud, definido como ausencia de patología o alteración analítica relevante clínicamente en alguno de los siguientes parámetros: glucosa, urea, creatinina, alanina y aspartato transaminasas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y recuentos de células sanguíneas (plaquetas, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos).

Los criterios de exclusión consistieron en patología general severa, enfermedades inmunológicas, cáncer, demencia o alteración cognitiva, enfermedad respiratoria crónica, hipertensión, diabetes, esperanza de vida inferior a 1 año, bajo nivel de colaboración y haber tomado acetilcisteína, vitaminas o antioxidantes durante los 6 meses previos al estudio.

Un grupo de mujeres de 50-69 años fue obtenido del personal trabajador del Hospital Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, mientras que el otro grupo, el de las mujeres de más de 69 años, se obtuvo de las usuarias del Servicio de Geriátrica del mismo Hospital y pertenecientes al Programa “Envejecer con éxito”. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 1000 candidatas, de las cuales 600 fueron

contactadas. De ellas, 140 aceptaron participar en el estudio, pero 90 fueron retiradas por los criterios de exclusión anteriormente comentados. Se calculó una muestra de aproximadamente 20 individuos por grupo experimental de acuerdo con las desviaciones estándar de la media de los parámetros en los grupos en estudio, un error de $\alpha=0,05$, potencia del 80% y riesgo de abandono del 10%, que se consideró mayor en las mujeres mayores de 69 años que en aquéllas de 50-69. Por tanto, de las 50 mujeres restantes, se seleccionaron 19 de 50-69 años y 21 de más de 69, de forma aleatoria. De las 40 participantes que iniciaron el estudio en la primera visita, 4 se retiraron del mismo (1 de 50-69 años y 3 de más de 69) y no acudieron a la segunda visita. Posteriormente, otras 2 mujeres mayores de 69 años decidieron abandonar el ensayo, 1 en la tercera visita y la otra en la cuarta. Así, finalmente se estudiaron 18 mujeres de 50-69 años y 16-18 mayores de 69.

Como control de edad adulta se empleó un grupo de 18 mujeres voluntarias compañeras de trabajo, familiares y conocidas del grupo investigador. Los criterios de inclusión fueron: (1) ser mujer de 30-49 años de edad, (2) gozar de una buena salud. Los criterios de exclusión fueron los mismos que aquellos para los grupos experimentales.

Todas las participantes recibieron información detallada acerca del objetivo del estudio y dieron consentimiento escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación científica, siendo respetado en todo caso su derecho a la privacidad. Las participantes potenciales dieron su consentimiento informado antes del inicio de cualquier procedimiento relativo al estudio. Las entrevistas se realizaron en una habitación privada del Departamento de Geriatria del Hospital Clínico San Carlos de Madrid por los médicos residentes Cesáreo Fernández y Antonio Rodríguez. Las muestras de sangre periférica (tomadas por punción venosa) fueron recogidas a la misma hora, en el curso de cada entrevista clínica, con objeto de controlar el efecto de las variaciones circadianas sobre el sistema inmunitario, y en tubos con citrato como anticoagulante. En los grupos experimentales, las muestras sanguíneas fueron tomadas antes de iniciarse la administración de NAC, a los 2 meses del inicio de dicha administración, una vez finalizada la misma (a los 4 meses) y 3 meses después de dicha finalización. A los controles de 30-49 años se les extrajo sangre una única vez, y su toma de muestra de desplegó a lo largo de todo el estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético acreditado de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y la Agencia Española del Medicamento. Se realizó conforme a las normas oficiales vigentes y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y

los principios de la Declaración de Helsinki. Un monitor de ensayos clínicos (PHIDEA, S.L.) aseguró el desarrollo adecuado del estudio en los términos mencionados.

Antioxidante en estudio: N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es un derivado de un aminoácido natural, la acetilcisteína, con un elevado grado de seguridad. El trabajo consistió en un estudio de Fase IV con un principio activo de una especialidad farmacéutica autorizada. El antioxidante en estudio fue Flumil® (producido por Zambon Group, S.p.A., Italia, y suministrado por Pharmazam, S.A., España), en forma de comprimidos orales efervescentes conteniendo 600 mg de NAC cada uno. Flumil® se encuentra disponible en farmacias en España sin necesidad de receta y es frecuentemente empleado como mucolítico. La dosis diaria consistió en 600 mg de NAC disueltos en medio vaso de agua poco antes de acostarse. La administración se realizó por la noche justo antes de acostarse durante 4 meses. La correcta administración fue comprobada en las entrevistas clínicas correspondientes.

Entrevistas clínicas

Se efectuaron un total de 4 visitas a los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales. La primera visita se realizó el día 1 para la selección final, mientras que en las siguientes se comprobó el correcto desarrollo del estudio. La segunda visita se llevó a cabo a los 2 meses de iniciada la administración de NAC, la tercera, a los 4 meses (el último día de administración del antioxidante), y la cuarta, 7 meses después de iniciarse el estudio (3 meses después de finalizar la administración de NAC). En cada una de ellas se realizó la extracción sanguínea.

En el curso de la primera entrevista clínica se anotaron los datos demográficos del paciente y las medicaciones concomitantes utilizadas, se realizó un examen físico completo, se evaluaron los síntomas y los parámetros funcionales, se dispensó el fármaco y se explicó al paciente cómo efectuar su correcta administración. Algunos de estos datos demográficos así como las fórmulas leucocitarias se detallan en las tablas 5-10. En las siguientes entrevistas se valoraron todos los cambios a esta situación y los acontecimientos adversos. Los parámetros generales de laboratorio: glucosa, urea, creatinina, alanina y aspartato transaminasas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, hematocrito, hemoglobina, volumen y hemoglobina corpuscular medios, y número de células sanguíneas (plaquetas, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), no mostraron

cambios de relevancia clínica, confirmando la seguridad de Flumil®. Únicamente se indicaron dos eventos adversos con probabilidad de encontrarse relacionados con el tratamiento, estreñimiento en una mujer de 50-69 años y prurito de espalda en una mujer mayor de 69 años. Ésta última decidió abandonar el estudio y no se incluyó finalmente. Ambos eventos se resolvieron sin complicaciones. Por el contrario, la mayoría de participantes (95% de la muestra) informó a lo largo del estudio de una sensación de bienestar general y presencia de menos infecciones en comparación con la situación previa al tratamiento. En la segunda y tercera visita se evaluó además la medicación que habían tomado las pacientes.

Tabla 5. Edad de las pacientes (años).

Edad	Media	Mediana	S.E.M	Mínimo	Máximo	n
50-69 años	54,35	52,78	0,81	51,15	63,69	19
≥ 70 años	78,78	77,32	1,36	70,59	91,86	20

Tabla 6. Peso de las pacientes (Kg).

Edad	Media	Mediana	S.E.M.	Mínimo	Máximo	n
50-69 años	71,15	69,00	3,32	48,00	106,00	19
≥ 70 años	63,18	66,25	2,19	44,00	78,00	20

Tabla 7. Altura de las pacientes (cm).

Edad	Media	Mediana	S.E.M.	Mínimo	Máximo	n
50-69 años	158,63	159,00	1,51	148,00	171,00	19
≥ 70 años	151,30*	151,00	1,18	140,00	165,00	20

Tabla 8. Dieta habitual de las pacientes.

Dieta habitual	50-69 años		≥ 70 años	
	n	%	n	%
Mediterránea equilibrada	18	94,74	20	100,00
Rica en ácidos grasos poliinsaturados	1	5,26	0	0,00

Tabla 9. Tabaquismo de las pacientes

Tabaquismo	50-69 años		≥ 70 años	
	n	%	n	%
Fumadoras	6	31,58	1	5,00*
No fumadoras	11	57,89	18	90,00*
Exfumadoras	2	10,53	1	5,00

Tabla 10. Parámetros generales de laboratorio de las pacientes (Fórmula Leucocitaria).

	Media	Mediana	S.E.M.	Mínimo	Máximo	n
Neutrófilos (%)						
50-69 años	55,66	56,70	1,93	41,70	71,90	19
≥ 70 años	61,27*	61,70	1,10	50,00	69,30	18
Linfocitos (%)						
50-69 años	35,59	35,20	1,64	21,90	49,80	19
≥ 70 años	28,38**	28,45	1,12	20,80	38,10	18
Monocitos (%)						
50-69 años	4,87	4,80	0,29	3,20	9,20	19
≥ 70 años	6,41*	6,35	0,58	2,10	12,90	18
Eosinófilos (%)						
50-69 años	1,96	1,50	0,34	0,50	6,60	19
≥ 70 años	2,06	1,30	0,41	0,40	6,20	18
Basófilos (%)						
50-69 años	0,44	0,50	0,04	0,20	0,70	19
≥ 70 años	0,63	0,55	0,09	0,20	1,90	18

** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al correspondiente valor en mujeres de 50-69 años.

3.2.2.2. Métodos en muestras humanas de sangre periférica.

3.2.2.2.1. Obtención de leucocitos y plasma de sangre periférica. Recuento y viabilidad celular.

- 1) *Extracción de sangre periférica:* Se tomaron 9 ml de sangre de cada individuo mediante punción estéril de la vena antecubital del brazo. Todas las extracciones fueron realizadas a primera hora de la mañana, en ayunas y en situación de reposo previo,

para evitar las variaciones circadianas y las consecuencias de la actividad física cotidiana en los niveles hormonales y en la función inmunitaria. La sangre fue dispensada en tubos estériles con citrato sódico (9 ml de sangre/1 ml de citrato sódico) como anticoagulante. Un volumen 1,5 ml de sangre fue reservado para los ensayos realizados en sangre total, y mantenido a 4 °C hasta su inmediata utilización.

- 2) *Obtención del plasma*: Se centrifugó 1 ml de la muestra de sangre periférica durante 20 min a 1000 g. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -20 °C hasta el momento de su estudio.
- 3) *Obtención de leucocitos*: Se realizó siguiendo una técnica descrita previamente (De la Fuente y Víctor, 2000). Tras la extracción de la sangre, y en ningún caso superándose un período de tres horas (durante el cual la muestra se mantiene a 4 °C), se efectuó la separación de las células sanguíneas mediante gradiente de densidad en condiciones de esterilidad. Para ello, en un tubo de cristal de calibre dieciocho se añadieron, en este orden, 3 ml de Histopaque de densidad 1,119, 3 ml de Histopaque de densidad 1,077 y 6 ml de sangre, deslizándolos suavemente por las paredes del tubo para evitar que se mezclen entre sí. Se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 700 g. Así, los hematíes quedan en el fondo del tubo, el plasma en la parte superior, y en la zona intermedia aparecen dos halos de células; el superior constituido por leucocitos mononucleares (en su mayoría linfocitos) y el inferior por polimorfonucleares (PMNs; en su mayoría neutrófilos). A continuación se extrajeron cada uno de los halos de células con ayuda de pipeta Pasteur. Las células recién separadas se lavaron dos veces con PBS, centrifugándolas a 4 °C durante 10 min a 300 g. Previo al último lavado, en caso de que el sedimento de las células estuviese contaminado por hematíes, se provocó la destrucción de los mismos mediante choque hipotónico. Para ello, se añadió 1 ml de agua destilada estéril al sedimento y se centrifugó durante 1 min a 600 g, eliminándose el sobrenadante.
- 4) *Recuento celular*: Una vez lavadas las suspensiones celulares, conteniendo aproximadamente un 98% de neutrófilos o de linfocitos, y eliminado el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml del medio empleado posteriormente en el ensayo más restrictivo; solución de Hank para los leucocitos PMNs neutrófilos y medio RPMI 1640 sin rojo fenol para los mononucleares. El recuento del número de células por ml se hizo del modo descrito con anterioridad.

- 5) *Viabilidad celular*: La viabilidad de las células obtenidas y utilizadas en los distintos ensayos fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán, ya descrito previamente. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, solamente se utilizaron las suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 98%.

3.2.2.2.2. Estudio de funciones inmunitarias.

Los PMNs neutrófilos de la suspensión celular obtenida de sangre periférica humana se ajustaron a 10^6 PMNs neutrófilos/ml de solución de Hank para llevar a cabo el estudio de las diferentes etapas del proceso fagocítico, a excepción del estudio de la capacidad de adherencia a endotelio, en el que se precisa la muestra de sangre completa. Las suspensiones de leucocitos mononucleares obtenidas de la separación por gradiente de densidad de la sangre total humana, se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas se ajustó en medio completo para el ensayo de respuesta proliferativa. La segunda alícuota se ajustó en RPMI sin rojo fenol, para la valoración de la quimiotaxis y la actividad citotóxica *Natural Killer*. La concentración final de células para ambas fue de 10^6 linfocitos/ml (De la Fuente et al., 2008).

Más adelante se detalla la metodología utilizada para el estudio de cada una de las etapas del proceso fagocítico en los PMNs neutrófilos y de las funciones mencionadas que se analizaron en los leucocitos mononucleares.

Cada ensayo, correspondiente a un individuo y una toma de muestra, fue realizado por duplicado o triplicado.

Capacidad de adherencia de los leucocitos

Para analizar la capacidad de adherencia al endotelio vascular de los neutrófilos y linfocitos de sangre periférica humana se utilizó el método de adherencia a fibra de nylon descrito por McGregor et al. (1974) y modificado posteriormente por De la Fuente et al. (1997). Mediante esta técnica se mide el porcentaje de células que, en un tiempo determinado, se adhieren a la superficie de la fibra de nylon empaquetada en columnas; hecho que reproduce *in vitro* la adherencia al endotelio que tiene lugar *in vivo*.

En la muestra de sangre completa (sin aislamiento de las poblaciones celulares), se efectuó el recuento de neutrófilos y linfocitos mediante el hemocitómetro de Neubauer en microscopio de contraste de fase con el objetivo de 40 aumentos. Para ello, se tomaron 50

μl de sangre diluída al 50% con solución de Hank, y se le añadieron 950 μl de líquido de Turk, que tiene la capacidad de lisar los hematíes y permite diferenciar la morfología de los leucocitos PMNs y mononucleares. Los resultados se expresaron como número de células por mm³. Por otra parte, la mezcla formada por 0,5 ml de sangre total y 0,5 ml de Hank (sangre diluída al 50% en solución de Hank) se hizo pasar por una columna de adherencia previamente preparada en pipeta Pasteur, dentro de la que se empaquetan, homogéneamente, 50 mg de lana de nylon con una altura de 1,25 cm. La pipeta se introdujo en un tubo de ensayo y se fijó con parafilm para que quedase perpendicular a la base sin tocar el vidrio. Pasados 10 min, el efluente cae en su totalidad por efecto de la gravedad. Se procedió entonces al recuento de neutrófilos y linfocitos en dicho efluente, de forma similar a como se hizo previo al paso por la columna de adherencia.

La diferencia entre el número de leucocitos presentes en la mezcla inicial y en el efluente, después de pasar por la columna de adherencia, da el número de los adheridos. El porcentaje de neutrófilos y linfocitos adheridos, que se expresó como Índice de Adherencia (IA), se calculó para cada uno de ellos según la ecuación:

$$IA = \left[\left(\text{leucocitos/mm}^3_{\text{totales}} - \text{leucocitos/mm}^3_{\text{efluente}} \right) / \text{leucocitos/mm}^3_{\text{totales}} \right] \times 100.$$

Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos

Se siguió una técnica similar a la previamente descrita para los leucocitos murinos (De la Fuente et al., 1997). Se emplearon alícuotas de 10⁶ PMNs neutrófilos/ml de solución de Hank o 10⁶ linfocitos/ml RPMI sin rojo fenol. En este caso, se contabilizó, al microscopio con objetivo de inmersión (100x), el número de neutrófilos o linfocitos que aparecieron en 20 campos tomados al azar de la cara inferior del filtro empleado en la cámara de Boyden. El valor obtenido en dichos recuentos es el IQ.

Capacidad de fagocitosis de los PMNs neutrófilos

Para valorar la capacidad de ingesta de cuerpos extraños (bolas de látex) que tienen los neutrófilos, se empleó la técnica descrita por De la Fuente et al. (1997) detallada con anterioridad para los macrófagos murinos. En este caso, se dispensaron en placas MIF alícuotas de 200 μl de la suspensión de PMNs ajustados a 10⁶ PMNs/ml, en solución de Hank. Los resultados se expresaron como IF, esto es, número de partículas ingeridas por 100 fagocitos tomados al azar, y EF, porcentaje de células, en las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula.

Niveles de anión superóxido intracelulares en los PMNs neutrófilos

Para el estudio de la capacidad de destrucción del material ingerido por los PMNs neutrófilos, se valoraron los niveles de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este radical libre es el primero de una cadena que se produce en el estallido respiratorio, y que conducen a la digestión del material fagocitado (Babior, 1999). Se mide gracias a la gran capacidad de este anión para reducir compuestos como el nitroazul de tetrazolio (NBT), que es convertido, en proporción equimolar, en formazán azul detectable por espectrofotometría (Bagasra et al., 1988).

El test de reducción de NBT se valoró aplicando el método descrito por Hedley-Currie (1978), y modificado por De la Fuente et al. (1991; 1997; 2008) y Alvarado et al. (2005). En tubos de vidrio (0,5 cm de diámetro), se dispensaron alícuotas de 250 μ l de la suspensión celular de PMNs (ajustados a 10^6 células/ml Hank), y se añadieron 250 μ l de NBT (1 mg/ml Hank). Seguidamente, se incorporaron 50 μ l de la suspensión de látex al 1% para estudiar la reducción del NBT en presencia de estímulo fagocítico (muestras estimuladas), y 50 μ l de Hank para el estudio de los niveles basales de anión superóxido (muestras no estimuladas). Transcurridos 60 min de incubación, en baño con agitación suave a 37°C, la reacción se detuvo introduciendo los tubos en hielo picado. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 min a 1600g y 4°C. En el pellet resultante de la centrifugación, se extrajo el NBT reducido utilizando 1 ml de dioxano para romper las células. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones anteriores. Se determinó las absorbancias de los sobrenadantes a 525 nm en espectrofotómetro empleando microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso óptico, con lo que se obtiene la medida de los niveles de superóxido intracelular (parámetro indicativo de la capacidad digestiva del material fagocitado). Los resultados se expresaron como nmol/ 10^6 células, tras extrapolar las absorbancias en una curva patrón, obtenida utilizando ditioeritrol como agente reductor del NBT.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

Para el estudio de la respuesta proliferativa en linfocitos humanos de sangre periférica, se sembraron 10^6 linfocitos/ml medio completo (RPMI 1640 con 1% gentamicina, 0,1 mg/ml, y suplementado con 10% suero fetal de ternera descomplementarizado), en alícuotas de 200 μ l, en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano, siguiendo un método similar al previamente descrito para las muestras

procedentes de ratón (Del Río et al., 1994; Carrasco et al., 1997; De la Fuente y Víctor, 2000; De la Fuente et al., 2008). En este caso, en los pocillos destinados a determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a mitógeno, se adicionaron 20 µl de fitohemaglutinina (De la Fuente et al., 2008), a la concentración correspondiente a una estimulación de la repuesta proliferativa óptima (PHA, 25 µg/ml). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se calcularon como la media aritmética de cpm en cada triplicado.

Actividad citotóxica Natural Killer (NK)

Se valoró la capacidad citotóxica NK de los leucocitos mononucleares procedentes de sangre periférica humana, para lo que se empleó la línea celular K562 procedente de un linfoma humano, que fue manipulada de forma similar a la línea YAC-1. Se siguió una técnica previamente descrita (De la Fuente et al., 2008), utilizando el kit colorimétrico comercializado (PROMEGA) ya comentado. Los linfocitos se ajustaron a 10⁶ células/ml RPMI sin rojo fenol, obteniéndose en el pocillo una relación efectoras:diana de 10:1. Los resultados se expresaron como % lisis, realizando los experimentos por triplicado.

3.2.2.2.3. Estudio de los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos.

Todos los sobrenadantes de cultivo destinados a la valoración de los niveles de citoquinas fueron mantenidos a -20 °C, descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000 g antes de la realización del ELISA de fase sólida, para eliminar partículas y agregados. Las muestras, los estándares y los controles de concentración conocida de citoquina se incorporaron a una placa de ensayo adsorbida con un anticuerpo específico frente a la citoquina humana. El principio fue similar para el análisis de los niveles de todas las citoquinas, con variaciones que se detallan e ilustran a continuación.

Niveles de IL-2 inducidos por PHA en sobrenadantes de cultivos de linfocitos

Los niveles de IL-2 presentes en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos de sangre periférica en humano, se determinó siguiendo el método descrito previamente por De la Fuente et al. (2008). Alícuotas de 100 µl de sobrenadante, recogidos en los pocillos de las placas de cultivo de los leucocitos tras 48 horas de incubación en presencia de PHA, se almacenaron a -20°C hasta la valoración en las mismas de IL-2 mediante ELISA comercial

(Fig. 12), cuyos componentes fueron mantenidos a 4 °C hasta el momento de realización de los ensayos. La técnica se ilustra brevemente a continuación:

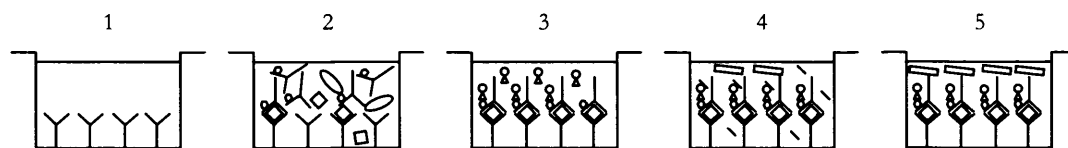


Figura 12. Sandwich ELISA de fase sólida para valoración de IL-2 humana. 1) Anticuerpo policlonal frente a IL-2 de humano adsorbido al fondo del pocillo. 2) Incubación a T° ambiente simultánea de la muestra y anticuerpo monoclonal frente a IL-2 de humano biotinilado. Lavado. 3) Incubación a T° ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Lavado. 4) Incubación a T° ambiente y oscuridad con sustrato: solución de tetrametilbenzidina (TMB). 5) Solución stop: H₂SO₄.

Niveles de TNF- α e IL-8 inducidos por LPS en sobrenadantes de cultivo de sangre total

En el caso del TNF- α (Fig. 13) y la IL-8 (Fig. 14), se utilizaron los sobrenadantes de cultivos de sangre total en presencia de LPS (Hernanz et al., 1996). Para ello, 500 μ l de la muestra de sangre periférica en citrato se diluyó 1/2 con medio RPMI 1640 sin glutamina. Posteriormente, se añadieron 10 μ l de gentamicina (0,1 mg/ml en tubo) y 10 μ l de LPS (0,25 μ g/ml en tubo). La mezcla se incubó durante 4 h en estufa a 37 °C con atmósfera de CO₂ y humedad a saturación. Finalmente, los tubos eppendorf se centrifugaron 10 min a 900 g para eliminar las células. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -20° C hasta el momento del ensayo. Los ELISAs de fase sólida empleados para la determinación de estas citoquinas se ilustran brevemente a continuación:

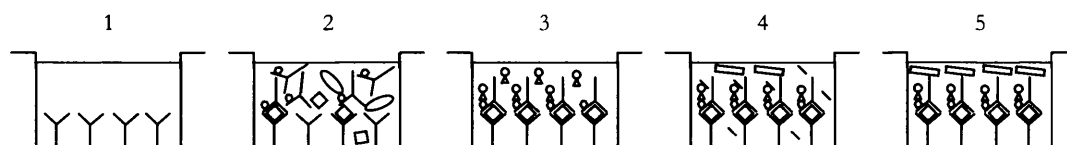


Figura 13. Sandwich ELISA de fase sólida para valoración de TNF- α humano. 1) Anticuerpo monoclonal frente a TNF- α de humano adsorbido al fondo del pocillo. 2) Incubación a T° ambiente simultánea de la muestra y anticuerpo monoclonal frente a TNF- α de humano biotinilado. Lavado. 3) Incubación a T° ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Lavado. 4) Incubación a T° ambiente y oscuridad con sustrato: solución de tetrametilbenzidina (TMB). 5) Solución stop: H₂SO₄.

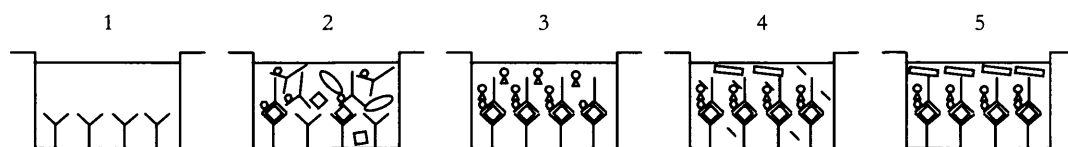


Figura 14. Sandwich ELISA de fase sólida para valoración de IL-8 humana. 1) Anticuerpo monoclonal frente a IL-8 de humano adsorbido al fondo del pocillo. 2) Incubación a T° ambiente simultánea de la muestra y anticuerpo policlonal frente a IL-8 de humano biotinilado. Lavado. 3) Incubación a T° ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Lavado. 4) Incubación a T° ambiente y oscuridad con sustrato: solución de tetrametilbenzidina (TMB). 5) Solución stop: H₂SO₄.

Una vez añadida la solución *stop*, las burbujas de aire fueron eliminadas y se midió la absorbancia a 450 nm. Opcionalmente, se tomó 620 nm (610-650 nm) como longitud de onda de referencia para la medida de estas 3 citoquinas, IL-2, TNF- α e IL-8 en humano. Los resultados se expresaron en pg/ml. A continuación se indican las características generales de los ELISAs:

Tabla 11. Características generales de los ELISAs empleados para la valoración de citoquinas en humano.

<i>ELISAs</i>	<i>IL-2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>
Mínimo detección (pg/ml)	<10	<8	<25
Rango (pg/ml)	31,25-1000	25-800	62,5-2000
Precisión intra-ensayo (pg/ml)	1,4-4,8	3,3	0,6-2
Precisión inter-ensayo (pg/ml)	1,8-5,5	9	1,96-6,13

3.2.2.2.4. Estudio del daño oxidativo a lípidos y de los niveles de compuestos antioxidantes en leucocitos y plasma de sangre periférica.

Marcador de daño oxidativo a lípidos: Niveles de malondialdehído (MDA)

Para evaluar el daño oxidativo a los lípidos plasmáticos se valoraron los niveles de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación lipídica. La valoración de MDA se llevó a cabo mediante una técnica previamente descrita por Chirico et al. (1993) con ligeras modificaciones (Álvarez, 2006), basada en el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El MDA tiene la capacidad de reaccionar con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), dando lugar a la formación de un compuesto coloreado rosáceo que tiene un máximo de absorción a 532 nm, el cual se detectó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las muestras plasmáticas fueron centrifugadas en frío (1100 g, 10 min, 4 °C) para la eliminación de posibles impurezas y se tomaron 100 μ l de los sobrenadantes para su valoración. Posteriormente se añadieron 150 μ l de H₃PO₄ 0,44M, 50 μ l de TBA al 0,6 %, y 10 μ l de butilhidroxitolueno (BHT) 3 mM en etanol puro. El BHT previene la autooxidación de la muestra durante la fase de calentamiento, evitando así la obtención de valores de MDA anormalmente elevados (Nohl et al., 1996).

Las muestras se agitaron y se incubaron en baño a 95°C durante 30 minutos. Durante esta fase de incubación se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos, con la consiguiente liberación del MDA. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción con hielo y se añadieron 250 µl de n-butanol, con objeto de crear una fase orgánica en la que se va a situar la molécula de MDA. Se centrifugó la muestra a 13000 rpm en microfuga durante 5 min a 4°C y se recogió la fase superior (fase orgánica). Finalmente se inyectaron 50 µl del sobrenadante en el HPLC. Las condiciones de la medición fueron las siguientes:

-Flujo: 0,4 ml/min.

-Fase móvil: 90% KH_2PO_4 50 mM pH 6,8 / 10% metanol, previamente filtrados con un kitasato para eliminar impurezas, empleando para ello filtros de 0,45 µm de diámetro de poro, y burbujeados con helio comprimido durante un tiempo mínimo de 30 min previos a la inyección y de manera continua al 30%.

-λ: detector a 532 nm.

-Columna: Novapack C18 (15cm x 3,9mm).

Para poner a punto los canales del cromatógrafo se empleó agua ultrapura previamente filtrada con un kitasato para aumentar su pureza, empleando para ello filtros de 0,45 µm de diámetro de poro. También se desgasificó con helio comprimido durante un tiempo mínimo de 30 minutos y de manera continua al 30%.

En todos los días de experimento se inyectaron estándares de concentraciones conocidas, realizándose curvas patrones diarias a partir de una solución madre de MDA-bis (dimetil acetal) de 10 mM en KH_2PO_4 50 mM pH 6,8. Con ayuda de dichas curvas, se calcularon los valores de daño oxidativo a lípidos plasmáticos, que fueron expresados en µM MDA.

Defensas antioxidantes

Niveles de glutatión total

Como ya se ha indicado con anterioridad, el glutatión es el antioxidante más potente presente en el organismo, gracias a la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. Se determinó experimentalmente el glutatión total en el interior de los leucocitos PMNs neutrófilos y de los mononucleares de sangre periférica, y en el plasma de los mismos individuos. El glutatión total se encuentra formado mayoritariamente por su forma

reducida (GSH). La valoración de GSH se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Tietze (1969).

Para la determinación del contenido en glutatión total de los PMNs y linfocitos de sangre periférica humana, las muestras fueron ajustadas a 10^6 células/ml en solución de Hank. Las células fueron entonces centrifugadas en frío (1100 g, 10 min, 4°C) y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, las células siguieron un procesamiento similar al descrito detalladamente para la valoración del GSH en los leucocitos peritoneales murinos (Alvarado et al., 2006a; 2006b). En el caso de las muestras plasmáticas, se centrifugó en las mismas condiciones citadas para la eliminación de posibles impurezas y se realizó la medida con los sobrenadantes, sin necesidad de procesamiento posterior. En la medida de la absorbancia se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

1) Reacción con muestra:

500 μ l NADPH, 70 μ l DTNB, 70 μ l muestra y 70 μ l GR.

2) Reacción sin muestra:

500 μ l NADPH, 70 μ l DTNB, 70 μ l solución de TCA y 70 μ l GR.

3) Blanco:

500 μ l NADPH, 70 μ l DTNB, 70 μ l muestra y 70 μ l solución de TCA.

Se realizó la curva patrón, en las mismas condiciones que las muestras, a partir de una solución madre que contenía 16 mg de GSH en 250 ml de solución de TCA de la que se hicieron sucesivas diluciones en tampón fosfato con EDTA 6,3 mM. Los resultados de GSH fueron expresados como nmol/ 10^6 células o μ M en el caso del plasma, con ayuda de las siguientes ecuaciones:

-en células:

$$\text{nmol GSH}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción con muestra - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción sin muestra.

$(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003$: pmol GSH en cubeta.

X: el número de células equivalente a los 70 μ l de muestra valorados ($1,4 \times 10^5$ células).

-y en plasma:

$$\mu\text{M GSH} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X)$$

siendo:

X: el volumen de plasma empleado y expresado en litros (7×10^{-5}).

Niveles de antioxidantes totales

Los niveles de antioxidantes plasmáticos fueron valorados mediante un kit comercial (Deltacolon) basado en la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ por la acción de todos los antioxidantes presentes. La cantidad de Cu^+ es evaluada mediante la medida del complejo formado por Cu^+ y batocuprina (BC). Este complejo es estable y posee una absorción típica a 480-490 nm. La precisión inter- e intra-ensayo tiene un coeficiente de variación de 2,2 y 4,2 %, respectivamente. Los resultados fueron expresados en unidades de capacidad antioxidante total (unidad/ml plasma). Una unidad de capacidad antioxidante total se define como el incremento en el valor de absorbancia de la reacción de 0,01 por minuto en cada ml de plasma a 37 °C.

3.2.2.5. Estudio de la función endocrina. Niveles plasmáticos de cortisol.

Los plasmas destinados a la valoración de los niveles de cortisol fueron mantenidos a -20 °C, descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000 g antes de la realización del ensayo. Éste consistió en un método colorimétrico comercial (Biolink) para la determinación cuantitativa de cortisol, basado en una detección inmunoenzimática competitiva. La precisión inter- e intra-ensayo de este método tiene un coeficiente de variación de 3,2 y 5,8 %, respectivamente. Los valores se expresaron como ng/ml con la ayuda de estándares de concentraciones conocidas.

3.2.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada una de las diferentes pruebas. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En el *Estudio del efecto de la ansiedad crónica y de la situación de estrés psicosocial por ausencia de hogar como modelos de envejecimiento prematuro en humanos*, el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la “t” de Student para muestras independientes.

Para el análisis estadístico del *Estudio del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre la funcionalidad y el estrés oxidativo de leucocitos de sangre periférica en mujeres postmenopáusicas*, se comprobó además la homogeneidad de las varianzas entre los grupos de edad a través del test de Levene, para el posterior análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del

test de Sidak para las comparaciones post hoc. Así mismo, las diferencias consecuencia del tratamiento, en cada grupo experimental, se evaluaron mediante la “t” de Student para muestras dependientes.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa.

Resultados

4.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.

4.1.1. Envejecimiento cronológico.

4.1.1.1. Cambios con la edad en las poblaciones, funcionalidad y estrés oxidativo de células peritoneales en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.

4.1.1.1.1. Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b, CD11c.

La presencia de algunos antígenos de diferenciación leucocitaria de membrana (CD) expresados por las principales células inmunitarias que pueden encontrarse en el peritoneo de ratones, esto es, CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b y CD11c, fue analizada por citometría de flujo en animales adultos maduros, viejos, muy viejos y longevos.

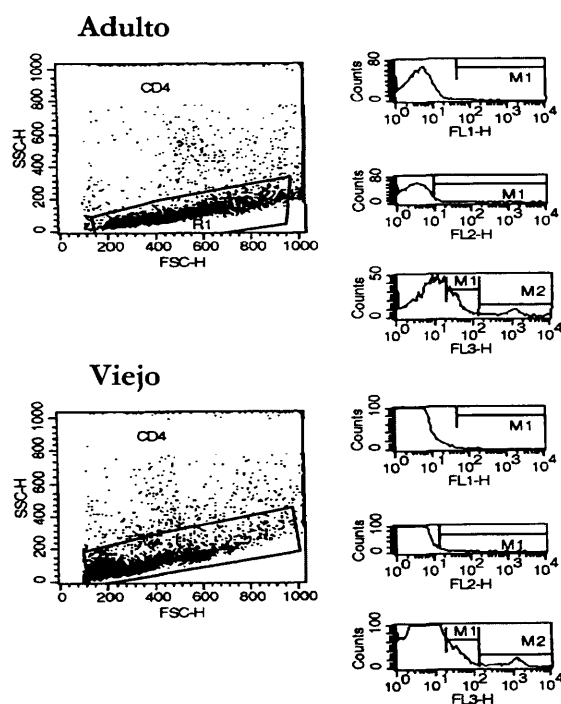


Figura 15. Expresión de CD4 en leucocitos peritoneales murinos para un ratón hembra ICR/CD1 adulto y uno viejo por citometría de flujo. A la izquierda puede observarse la muestra peritoneal en tamaño (SSC-H) y complejidad (FSC-H). En la región marcada, de la que se descartaron las partículas de gran tamaño por poder tratarse de complejos celulares, se analizó la fluorescencia en FL3-H, en la que emite el fluoróforo unido al anticuerpo anti-CD4 empleado. Se observó la presencia de dos picos, siendo el de alta intensidad (M2) el que corresponde con los linfocitos T CD4.

El porcentaje de células que expresan **CD4** no varió a lo largo de la edad. Dado que se tomó como válida únicamente la alta expresión de este antígeno, puesto que puede ser expresado en baja intensidad por otras estirpes celulares como es el caso de los macrófagos (Fig. 15), se puede decir que básicamente se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 o colaboradores (Th) (Tabla 12).

Tampoco varió significativamente a lo largo del envejecimiento el porcentaje de células que expresan **CD8**, fundamentalmente linfocitos T citotóxicos, si bien existió una tendencia hacia mayores valores en longevos que en adultos ($P=0,082$) (Tabla 12).

El **CD25** forma parte del receptor de IL-2, pudiendo ser expresado por linfocitos T CD4 y CD8 activados, T reguladores, NK, linfocitos B y macrófagos. De este modo, no define una estirpe celular, sino que indica más bien un tipo de respuesta funcional hacia Th1. La edad produjo un efecto altamente significativo ($P<0,001$) sobre el porcentaje de células que expresan esta cadena alfa del receptor de IL-2, que fue mayor en el peritoneo de animales longevos que en el de adultos, viejos ($P<0,001$) y muy viejos ($P<0,05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b y CD11c (%) en leucocitos peritoneales murinos, procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos, muy viejos y longevos.

	Adultos	Viejos	Muy Viejos	Longevos
% CD4	6,29±2,75	4,22±0,88	8,37±1,92	5,26±1,63
% CD8	2,03±0,45	3,57±1,00	3,18±0,81	4,87±1,12
% CD25	11,05±2,98	6,01±2,32***	28,44±9,84•	62,17±10,69***
% CD19	51,28±10,32	40,66±14,07	54,73±12,95	73,83±5,61
% CD11b	14,11±3,71	8,27±2,30•	37,44±16,46	42,17±9,60
% CD11c	2,32±0,76	0,59±0,15•	1,30±0,48	7,20±1,94

Se muestra la media \pm el error estándar de 5-10 valores (9-10 adultos maduros; 5-7 viejos; 6-7 muy viejos; 6-10 longevos) correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta. ••• $P<0,001$, • $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

No se observaron cambios significativos con la edad en el porcentaje de células que expresan **CD19**, específico de linfocitos B (Tabla 12).

Con respecto a la cantidad relativa de células que expresan **CD11b**, fundamentalmente macrófagos, se observó un efecto significativo de la edad ($P<0,05$), de

modo que los animales longevos tendieron hacia mayores valores que los adultos ($P=0,077$), tendencia que se hizo significativa con respecto a los viejos ($P<0,05$) (Tabla 12).

Por último, el porcentaje de células dendríticas, determinado mediante la expresión del antígeno de diferenciación leucocitaria **CD11c**, también varió con la edad ($P<0,01$). Los animales viejos mostraron menores valores que los longevos ($P<0,05$), y esa misma tendencia tuvieron los muy viejos con respecto a éstos ($P=0,059$). No se observaron cambios significativos entre adultos y longevos (Tabla 12).

4.1.1.1.2. Capacidad funcional de los leucocitos.

Macrófagos: Quimiotaxis, fagocitosis y niveles de ROS intracelulares

Se observó un efecto general de la edad disminuyendo las capacidades quimiotáctica y fagocítica ($P<0,001$) de los macrófagos peritoneales murinos, así como la estimulación de los niveles de ROS intracelulares en los leucocitos de dicha localización ($P<0,05$) (Fig. 16).

La **quimiotaxis de macrófagos** (Fig. 16A) fue similar en individuos viejos (I.Q.= 471 ± 24) con respecto a los adultos (I.Q.= 498 ± 25), si bien disminuyó muy significativamente ($P<0,001$) en los muy viejos (I.Q.= 308 ± 13). Por otra parte, los longevos (I.Q.= 593 ± 18) presentaron mayor ($P<0,05$) índice quimiotáctico que los adultos.

En cuanto a la **fagocitosis**, medida como índice (Fig. 16B) y eficacia fagocítica (Fig. 16C), se observó una disminución muy significativa ($P<0,001$) de esta función en viejos (I.F.= 417 ± 36 y E.F.= 66 ± 2) y más aún en muy viejos (I.F.= 307 ± 28 y E.F.= 56 ± 3) en relación a los adultos (I.F.= 624 ± 24 y E.F.= 82 ± 2). No obstante, los individuos longevos mantuvieron una función fagocítica preservada (I.F.= 628 ± 25 y E.F.= 76 ± 3), similar a la de adultos.

Por último, el porcentaje de estimulación de los niveles de **ROS** intracelulares en presencia de PMA (Fig. 16D) mostró una tendencia a la disminución tanto en viejos (131 ± 6 %) como en muy viejos (131 ± 12 %) en relación a los adultos (158 ± 7), que sólo fue significativa en la edad longeva (124 ± 7 %) ($P<0,05$).

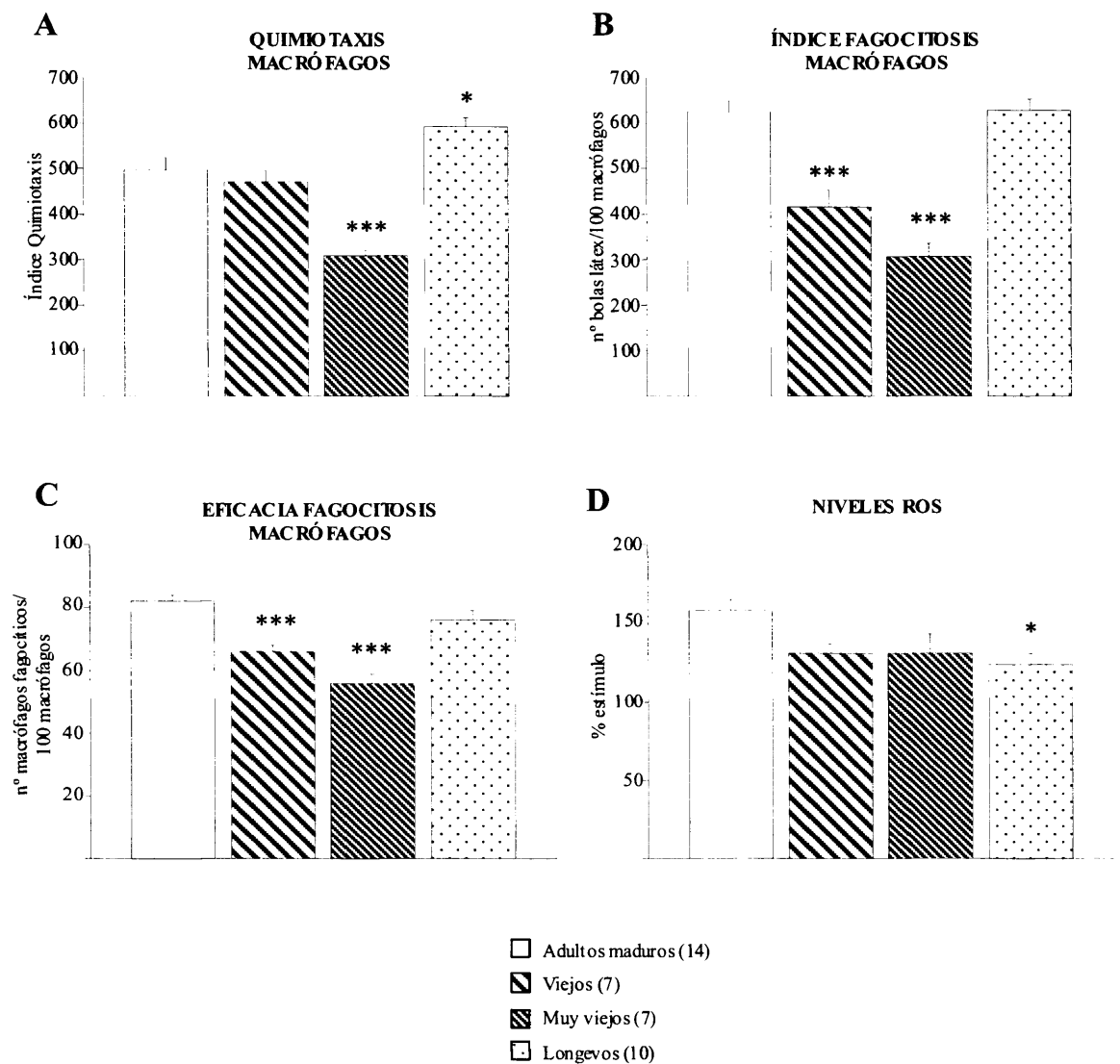


Figura 16. Índice de quimiotaxis (número de macrófagos) (A), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 macrófagos) (B) y eficacia de fagocitosis (número de macrófagos fagocíticos/100 macrófagos) (C) de macrófagos peritoneales murinos, y niveles de ROS intracelulares en presencia de PMA (% estímulo) (D) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Linfocitos: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Con respecto a la **capacidad quimiotáctica de los linfocitos** peritoneales murinos, se observó un efecto general de la edad disminuyéndola ($P < 0,001$) (Fig. 17). Así, esta función apareció disminuida ($P < 0,001$) en individuos viejos (I.Q.= 319 ± 24) y en los muy viejos (I.Q.= 493 ± 35) con respecto a los adultos (I.Q.= 791 ± 39). Los longevos

mostraron un índice de quimiotaxis de linfocitos preservado ($I.Q.=824\pm30$), similar al de adultos.

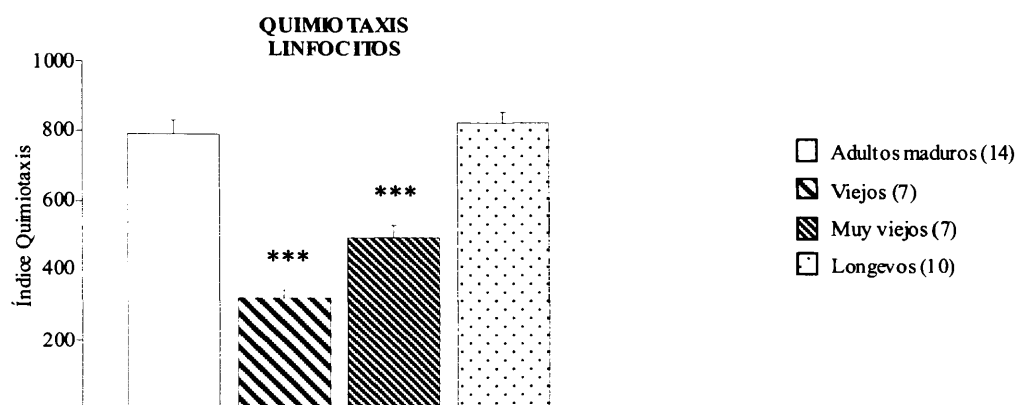


Figura 17. Índice de quimiotaxis de linfocitos peritoneales murinos (número de células) de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

En relación a la **proliferación**, no existió efecto de la edad a nivel basal, mientras que sí se dio un efecto altamente significativo de ésta sobre la linfoproliferación estimulada por los mitógenos LPS, específico de linfocitos B, y ConA, específico de linfocitos T ($P<0,001$) (Fig. 18).

En los cultivos basales, los viejos (1071 ± 28 cpm), los muy viejos (1383 ± 271 cpm) y los longevos (1639 ± 190 cpm) mostraron valores similares a los de los adultos (1267 ± 129 cpm), si bien se observó una tendencia hacia menores valores en viejos que en longevos. Los longevos (3815 ± 182 cpm) tuvieron una menor ($P<0,01$) proliferación en respuesta al mitógeno LPS con respecto a los adultos (4581 ± 100 cpm), que fue aún más baja ($P<0,001$) en viejos (2809 ± 217 cpm) y en muy viejos (3131 ± 91 cpm). En presencia de ConA, los viejos (1872 ± 92 cpm) mostraron una menor ($P<0,001$) linfoproliferación en relación a los adultos (3111 ± 136 cpm), mientras que muy viejos (2847 ± 33 cpm) y longevos (3448 ± 113 cpm) tuvieron valores más similares a los de dichos adultos. No obstante, la proliferación en respuesta a ConA de los linfocitos de los muy viejos fue menor ($P<0,01$) que la de los linfocitos procedentes de los individuos longevos.

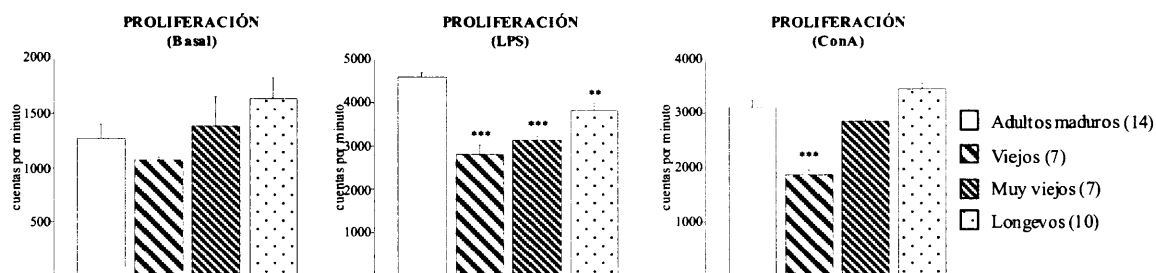


Figura 18. Proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales murinos no estimulados (basal) y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

En lo que respecta a la **actividad NK** de los leucocitos peritoneales murinos a lo largo de la edad, se observó un efecto altamente significativo de ésta disminuyéndola ($P < 0,001$) (Fig. 19). Así, existió una tendencia a la disminución de dicha función en individuos viejos (% lisis = 39 ± 24), que se hizo significativa ($P < 0,05$) en los muy viejos (% lisis = 35 ± 3) con respecto a los adultos (% lisis = 47 ± 2). Los longevos mantuvieron la actividad citotóxica a niveles similares a los de los individuos adultos (% lisis = 54 ± 4).

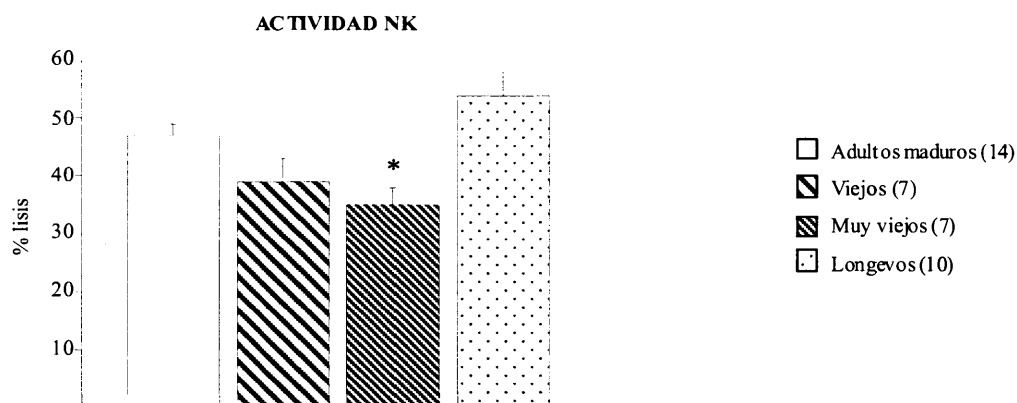


Figura 19. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Citoquinas reguladoras y factores de crecimiento

La edad produjo un efecto altamente significativo ($P<0,001$) sobre los niveles basales de IL-5 e IL-17, y muy significativo ($P<0,01$) sobre los de IL-2 e IL-9. Los niveles de VEGF ($P<0,001$) y de IL-17 ($P<0,05$) en respuesta a LPS se vieron afectados en función de la edad, mientras que ante el estímulo ConA lo fueron los de IL-2, GM-CSF ($P<0,001$) e IL-5 ($P<0,05$) (Fig. 20). En general, los longevos presentaron niveles más parecidos a los de adultos en todas las citoquinas que los viejos y los muy viejos.

No existieron diferencias significativas en los niveles basales de **IL-2** (Tabla 13 y Fig. 20A) en viejos y muy viejos con respecto a los adultos, pero los longevos mostraron mayores ($P<0,01$) valores de esta citoquina en condición basal. Con respecto a la respuesta ante LPS, viejos, muy viejos y longevos presentaron niveles similares de IL-2 a los de los adultos, si bien existió una tendencia a la disminución en viejos. Los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos estimulados con ConA fueron menores ($P<0,001$) en viejos y muy viejos que en adultos, mientras que los longevos mostraron valores mayores ($P<0,05$) a los de éstos. Además, los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales en presencia de ConA fueron determinados, no sólo a través de luminometría, sino también mediante ELISA, que corroboró básicamente los resultados descritos con anterioridad. Así, viejos ($25,52\pm5,55$ pg/ml) y muy viejos ($37,49\pm6,33$ pg/ml) mostraron valores menores ($P<0,001$) de esta citoquina que los adultos ($120,00\pm9,15$ pg/ml), mientras que los longevos ($157,14\pm7,02$ pg/ml) tuvieron niveles más elevados ($P<0,01$).

Los muy viejos mostraron menores ($P<0,001$) niveles de **IL-5** (Tabla 13 y Fig. 20B) en condiciones basales que los adultos, mientras que viejos y longevos presentaron valores más preservados. Estas diferencias desaparecieron en respuesta a LPS, de forma que viejos, muy viejos y longevos tuvieron niveles similares a los presentes en los adultos, si bien siguió existiendo una tendencia hacia valores menores en muy viejos. En presencia de ConA, los muy viejos mostraron de nuevo valores menores ($P<0,05$) que los adultos. Esa misma tendencia se observó en los viejos, pero de nuevo los longevos presentaron niveles conservados.

Los longevos tuvieron mayores ($P<0,01$) niveles de **IL-9** (Tabla 13 y Fig. 20C) en condición basal que los adultos, mientras que viejos y muy viejos mostraron niveles similares a éstos. En los sobrenadantes de cultivo de leucocitos en presencia de los

Tabla 13. Niveles de IL-2 (A), IL-5 (B), IL-9 (C), IL-17 (D), GM-CSF (E) y VEGF (F) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

(pg/ml)	Adultos	Viejos	Muy viejos	Longevos
IL-2				
Basal	1,13±0,30	0,74±0,26	1,92±0,34	2,68±0,39
LPS	1,39±0,19	0,79±0,12	1,07±0,22	1,44±0,21
ConA	96,71±8,92	12,82±2,32	21,85±4,27	137,57±10,99
IL-5				
Basal	2,37±0,19	1,77±0,34	0,86±0,30	1,89±0,2
LPS	2,23±0,23	2,34±0,24	1,32±0,45	2,15±0,25
ConA	12,96±2,65	5,52±1,11	3,63±1,17	9,05±1,90
IL-9				
Basal	13,55±2,16	13,43±2,67	14,21±2,30	24,17±2,64
LPS	21,11±2,41	19,92±1,59	19,19±4,62	24,55±2,16
ConA	12,33±1,28	13,82±2,73	16,70±3,06	13,05±1,62
IL-17				
Basal	35,63±2,47	21,08±0,54	13,87±2,16	22,59±3,38
LPS	198,43±29,32	85,44±23,53	130,00±32,60	207,05±22,18
ConA	175,94±28,10	103,57±22,46	132,80±36,25	212,82±30,89
GM-CSF				
Basal	8,53±0,83	12,55±2,62	9,87±2,07	9,82±1,88
LPS	12,87±1,04	13,58±2,03	12,88±1,82	14,13±2,71
ConA	27,25±3,20	14,67±3,57	35,86±7,07	60,83±10,14
VEGF				
Basal	18,08±2,10	19,05±2,41	23,45±3,75	13,14±2,97
LPS	24,38±2,37	21,91±1,58	42,86±4,98	25,58±1,96
ConA	24,01±2,76	16,36±1,77	21,59±3,50	27,32±3,45

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

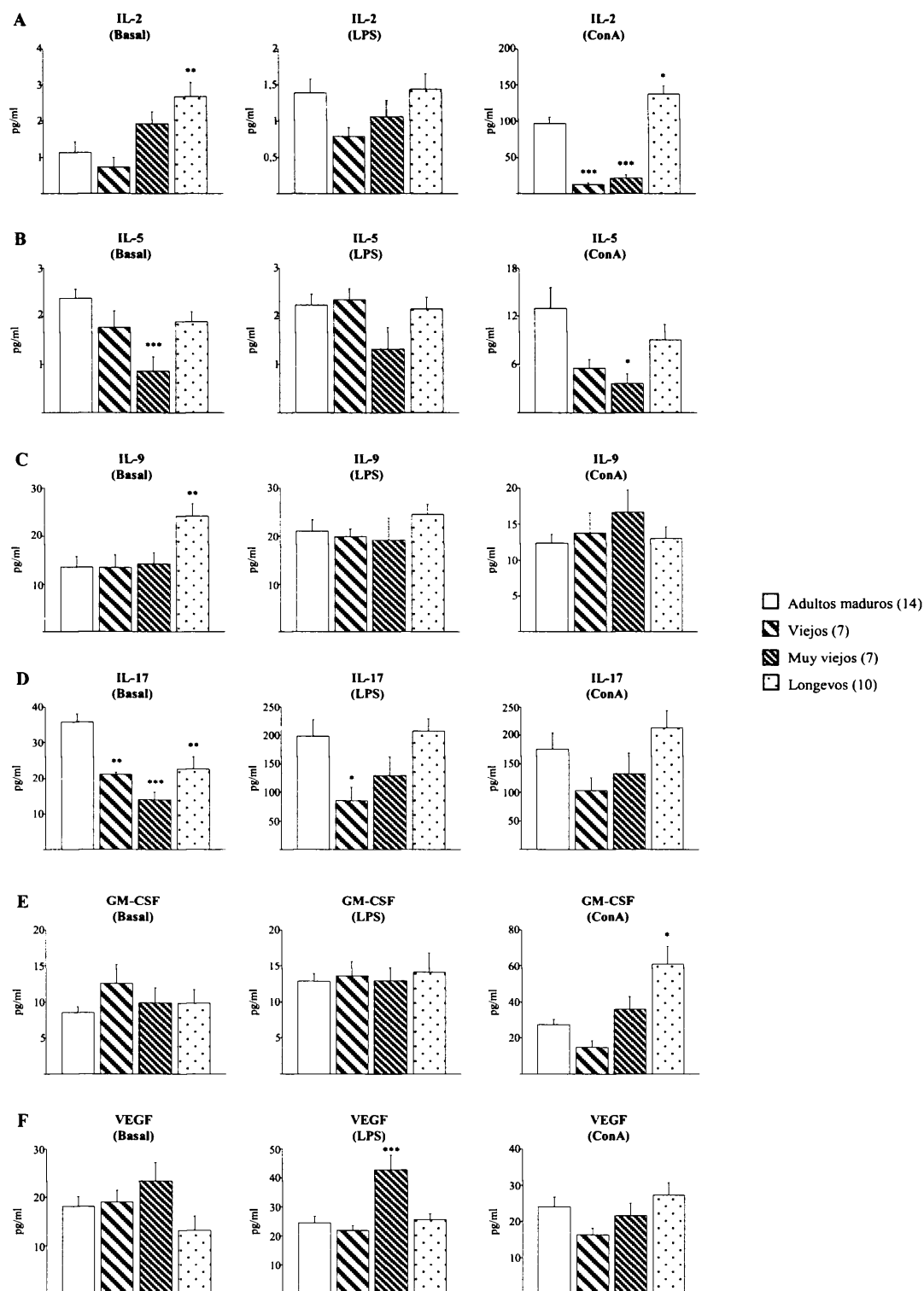


Figura 20. Niveles de IL-2 (A), IL-5 (B), IL-9 (C), IL-17 (D), GM-CSF (E) y VEGF (F) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

estímulos LPS y ConA, no se observaron diferencias a lo largo de la edad en los niveles de IL-9, respondiendo viejos, muy viejos y longevos con valores similares a los de los adultos.

Los niveles basales de **IL-17** (Tabla 13 y Fig. 20D) fueron menores en viejos y longevos ($P<0,01$), y aún más bajos en muy viejos ($P<0,001$), con respecto a los adultos. Los viejos respondieron al LPS con niveles más bajos que los de los adultos ($P<0,05$), mientras que los muy viejos mostraron una respuesta más preservada con tendencia a la baja. Los longevos mantuvieron los niveles de IL-17 en presencia de LPS al nivel de los adultos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de esta citoquina en presencia de ConA en viejos, muy viejos y longevos con respecto a los adultos si bien el perfil fue similar al encontrado en respuesta a LPS. Con respecto al **GM-CSF** (Tabla 13 y Fig. 20E), no se encontraron diferencias significativas entre los valores de este factor de crecimiento en los sobrenadantes de cultivos basales o estimulados con LPS en viejos, muy viejos y longevos con respecto a los adultos. No obstante, en presencia de ConA, los longevos mostraron valores mayores que los adultos ($P<0,05$), observándose esa misma tendencia en muy viejos y contraria, es decir, hacia niveles más bajos en viejos.

Finalmente, el **VEGF** (Tabla 13 y Fig. 20D) no cambió a nivel basal ni en presencia de ConA entre viejos, muy viejos y longevos en relación a los adultos. No obstante, muy viejos y longevos mostraron tendencias contrarias en estado basal, a la alza y a la baja, respectivamente. En respuesta a LPS, los viejos mostraron valores más elevados ($P<0,001$) que los de los adultos, mientras que viejos y longevos presentaron niveles preservados de este factor de crecimiento.

4.1.1.1.3. Estrés oxidativo e inflamatorio en los leucocitos.

Marcadores de oxidación e inflamación

- ***Niveles de glutatión oxidado***

Se observó un efecto general de la edad aumentando el contenido en glutatión oxidado (GSSG) intracelular de leucocitos peritoneales murinos ($P<0,01$) (Fig. 21). Los valores de GSSG en leucocitos de viejos ($7,27\pm0,68 \times 10^{-3}$ nmol/ 10^6 leucocitos) aumentaron significativamente ($P<0,05$) con respecto a los adultos ($5,30\pm0,22 \times 10^{-3}$ nmol/ 10^6 leucocitos). Esta misma tendencia mostraron los muy viejos ($6,24\pm0,66 \times 10^{-3}$ nmol/ 10^6 leucocitos).

leucocitos), mientras que los niveles de GSSG aparecieron preservados en los leucocitos de los longevos ($4,58 \pm 0,49$ nmol/ 10^6 $\times 10^{-3}$ leucocitos).

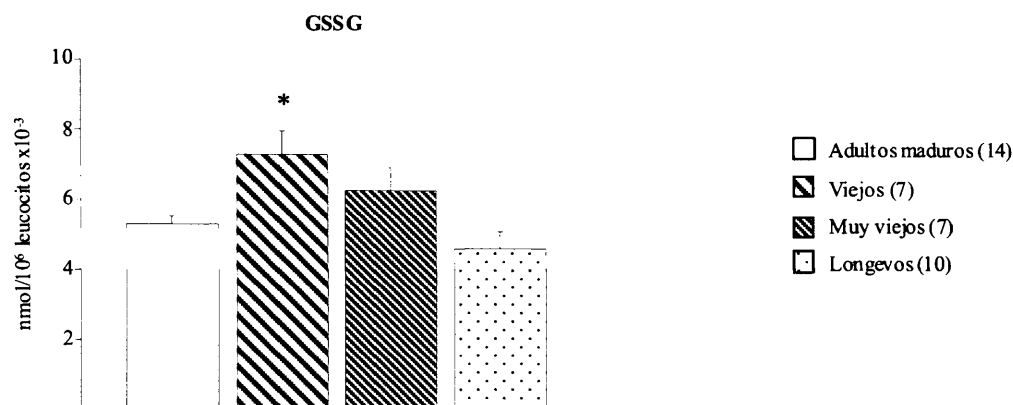


Figura 21. Valores de glutatión oxidado (GSSG) (nmol/ 10^6 leucocitos $\times 10^{-3}$) en leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

- **Actividad xantina oxidasa**

La figura 22 muestra los cambios con la edad en la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO) de los leucocitos peritoneales murinos. Se observó un efecto general de la edad sobre dicha actividad ($P < 0,001$). Así, la actividad XO aumentó muy significativamente ($P < 0,01$) en los leucocitos de viejos ($1,65 \pm 0,12$ mU/mg proteína) con respecto a esas células de adultos ($1,26 \pm 0,05$ mU/mg proteína). La misma tendencia se observó en los muy viejos ($1,52 \pm 0,1$ mU/mg proteína), a pesar de que en ellos la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. Los longevos mostraron una actividad enzimática más preservada, apreciándose incluso cierta tendencia hacia niveles más bajos que en los adultos ($1,03 \pm 0,05$ mU/mg proteína).

- **Activación del factor nuclear κ B**

La figura 23 muestra los cambios con la edad en la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) en los extractos nucleares de leucocitos peritoneales murinos. Se observó un efecto general altamente significativo de la edad sobre la activación de dicho factor de transcripción ($P < 0,001$). De este modo, aumentó ($P < 0,001$) en los leucocitos de viejos (2533 ± 156 unidades arbitrarias de densitometrado, UAD) y lo hizo aún más en las células

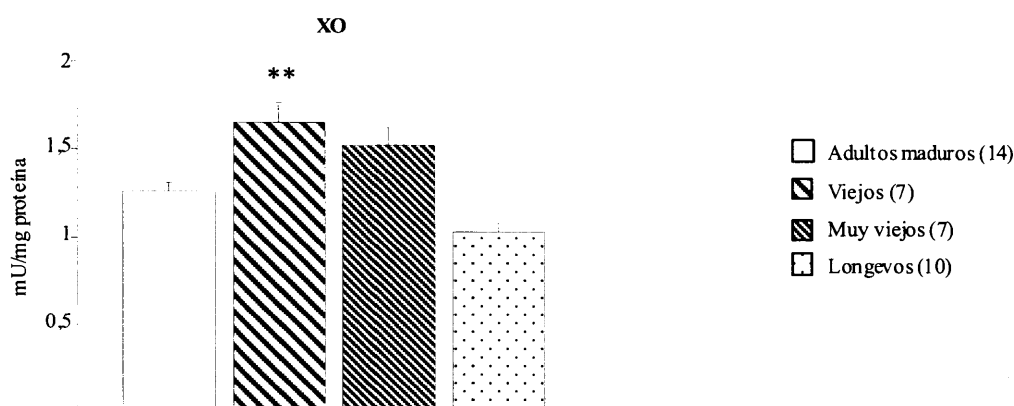


Figura 22. Actividad xantina oxidasa (XO) (mU/mg proteína) en leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

inmunitarias de los muy viejos (4231 ± 246 UAD) con respecto a los adultos (881 ± 244 UAD). Los longevos mostraron una activación de NF κ B más controlada, presentando valores similares a los de adultos (1306 ± 402 UAD).

Cabe destacar que únicamente un animal de los diez viejos y otro de los diez muy viejos en los que se había estudiado la activación nuclear leucocitaria del NF κ B alcanzaron finalmente la longevidad (138 y 132 semanas, respectivamente), y de modo interesante estos dos ratones fueron los únicos de sus grupos de edad que habían mostrado una activación controlada del NF κ B en sus leucocitos (Fig. 23).

• *Expresión de membrana de receptores Toll 2 y 4*

La expresión de receptores Toll 2 (TLR2) y Toll 4 (TLR4) en membrana fue determinada en las poblaciones celulares peritoneales que expresan CD4+, CD8+, CD19+, CD25+, CD11b+ y CD11c+, mediante citometría de flujo.

Con respecto al **TLR2 en linfocitos T**, se observó un efecto general de la edad ($P < 0,05$) en el porcentaje de células **CD4+-TLR2+**, que fue mayor ($P < 0,05$) en el peritoneo de los muy viejos ($59,06 \pm 12,87$ %) que en el de adultos ($31,47 \pm 3,41$ %), y también que en el de viejos ($32,34 \pm 3,10$ %). Los longevos mostraron una cantidad relativa de células CD4+ positivas para TLR2 preservada ($39,82 \pm 2,37$ %) (Fig. 24A). Un patrón

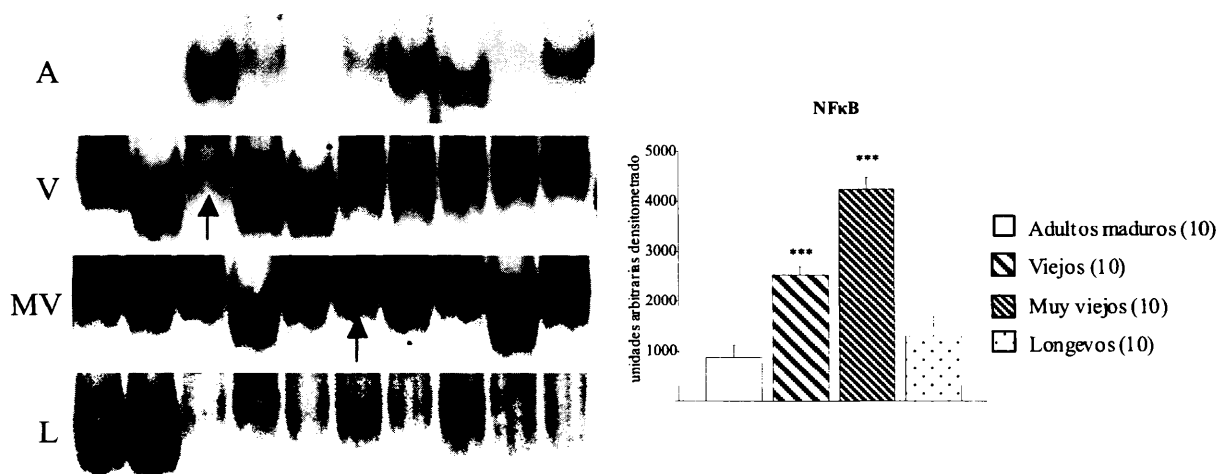


Figura 23. Activación del factor de transcripción NFκB (unidades arbitrarias de densitometrado) en extractos nucleares (15 µg proteína) de leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Izq.: Ejemplos de EMSAs obtenidos. Los sujetos correspondientes a las bandas marcadas con flechas fueron los únicos de sus grupos de edad que alcanzaron finalmente la longevidad extrema. A, adultos maduros; V, viejos; MV, muy viejos; L, longevos. Dcha.: Densitometrado. Cada columna representa la media ± el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

similar mostró la población relativa de células **CD8+** positiva para TLR2, sobre la que se observó también efecto global del envejecimiento ($P < 0,05$). Así, los muy viejos ($56,36 \pm 4,34$ %) tuvieron mayores ($P < 0,05$) valores que los adultos ($37,20 \pm 3,65$ %) y que los viejos ($32,70 \pm 5,37$ %), mostrando los longevos porcentajes preservados ($42,75 \pm 5,59$ %) (Fig. 24B).

Con respecto al **TLR4 en linfocitos T**, se observó un efecto general de la edad ($P < 0,05$) en el porcentaje de células **CD4+-TLR4+**, que fue mayor ($P < 0,05$) en el peritoneo de los muy viejos ($44,59 \pm 4,11$ %) que en el de adultos ($26,41 \pm 4,15$ %), y también que en el de viejos ($26,70 \pm 2,45$ %). Los longevos mostraron una cantidad relativa de células **CD4+** positivas para TLR4 preservada ($29,65 \pm 3,81$ %) (Fig. 25A). No se observaron cambios significativos en la población relativa de células **CD8+** positiva para TLR4 a lo largo de la edad, de forma que adultos ($37,99 \pm 4,24$ %), viejos ($30,85 \pm 4,17$ %), muy viejos ($47,49 \pm 5,81$ %) y longevos ($44,78 \pm 4,27$ %) mostraron porcentajes similares (Fig. 25B).

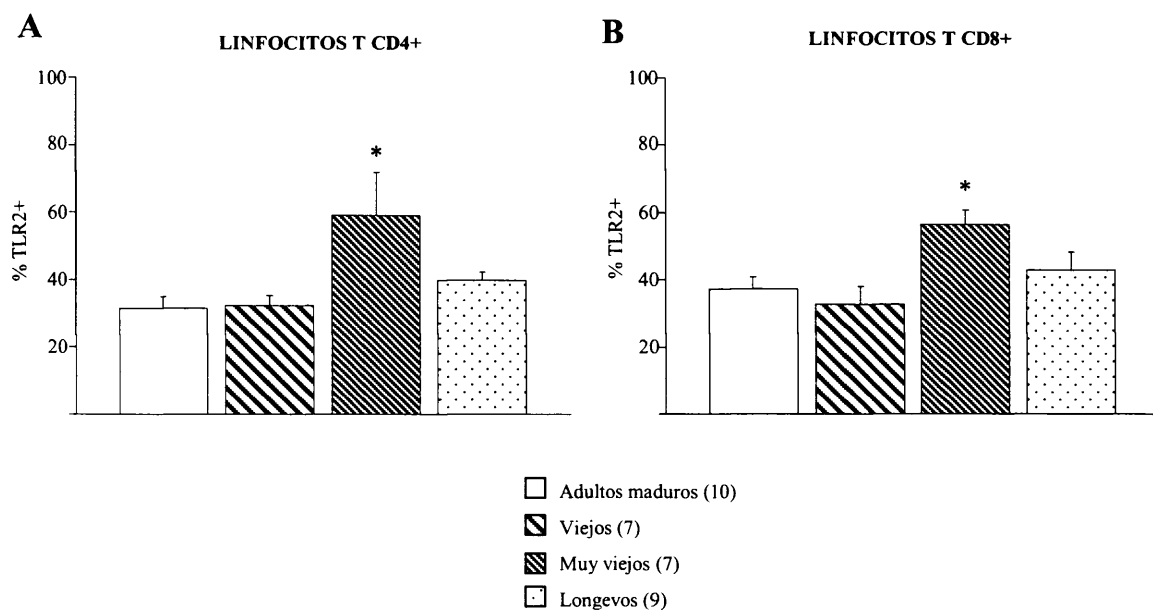


Figura 24. Porcentaje de células CD4 y CD8 que expresan el receptor Toll 2 (TLR2) en membrana (% TLR2+) en la población total de células CD4 (A) y CD8 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

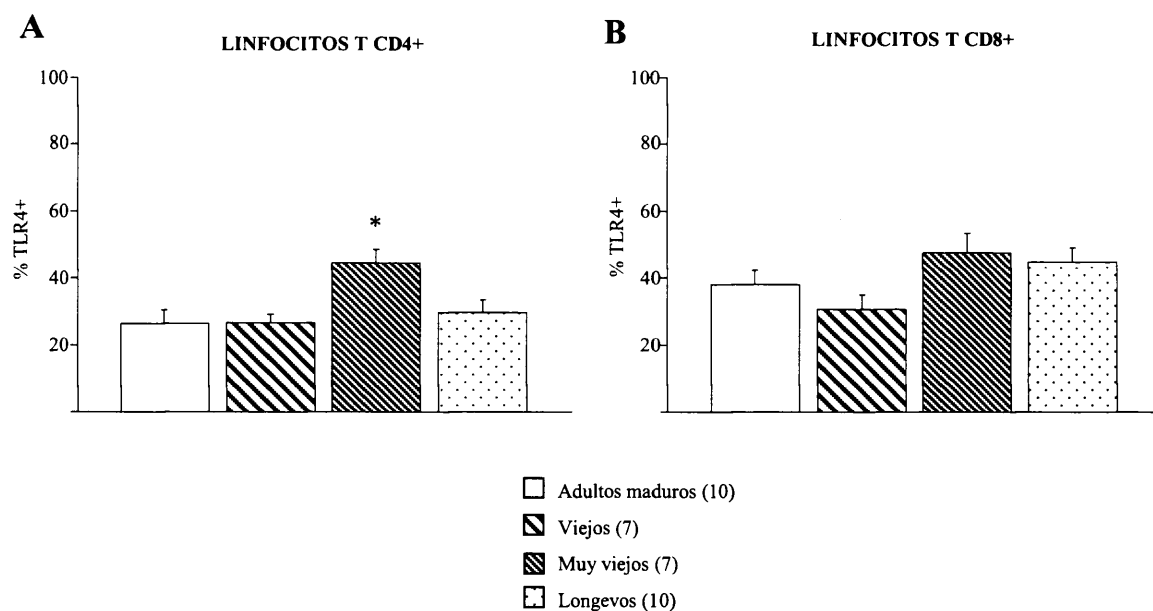


Figura 25. Porcentaje de células CD4 y CD8 que expresan el receptor Toll 4 (TLR4) en membrana (% TLR4+) en la población total de células CD4 (A) y CD8 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Tampoco se observaron cambios con la edad en la población relativa de células **CD25 positivas para TLR2**. De esta forma, adultos ($75,88 \pm 3,44$ %), viejos ($78,33 \pm 5,43$ %), muy viejos ($85,78 \pm 5,47$ %) y longevos ($83,39 \pm 5,00$ %) tuvieron porcentajes similares de células CD25+TLR2+ (Fig. 26A). Con respecto al **TLR2 en linfocitos B** o CD19 (Fig. 26B), se observó un efecto general de la edad ($P < 0,05$) en el porcentaje de células CD19+TLR2+, que fue mayor ($P < 0,05$) en el peritoneo de los longevos ($79,22 \pm 9,75$ %) que en el de adultos ($41,38 \pm 8,98$ %). Los viejos ($66,83 \pm 7,54$ %) y muy viejos ($54,14 \pm 9,02$ %) no mostraron cambios significativos en la cantidad relativa de células CD19+ positivas para TLR2 respecto a adultos (Fig. 26B).

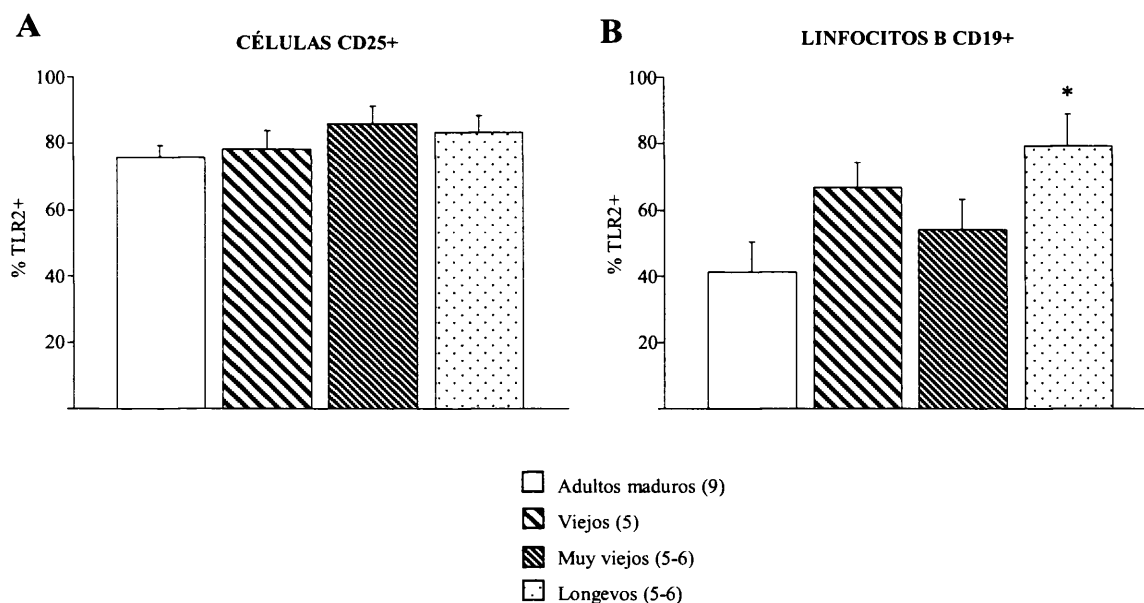


Figura 26. Porcentaje de células CD25 y CD19 que expresan el receptor Toll 2 (TLR2) en membrana (% TLR2+) en la población total de células CD25 (A) y CD19 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Un patrón similar al anteriormente descrito se observó para el porcentaje de células CD25 y CD19 positivas para TLR4. No se apreciaron cambios con la edad en la población relativa de células **CD25 positivas para TLR4**. De nuevo, adultos ($47,61 \pm 7,58$ %), viejos ($43,03 \pm 6,82$ %), muy viejos ($41,86 \pm 9,07$ %) y longevos ($61,45 \pm 6,92$ %) tuvieron porcentajes similares de células CD25+TLR4+ (Fig. 27A). Con respecto al **TLR4 en linfocitos B** (Fig. 27B), se observó, al igual que con TLR2, un efecto general de la edad

($P<0,01$) en el porcentaje de células CD19⁺-TLR4⁺, que fue mayor en el peritoneo de los longevos ($64,63\pm13,91\%$) que en el de adultos ($18,32\pm7,02\%$, $P<0,01$), viejos ($16,72\pm7,63\%$, $P<0,05$) y muy viejos ($18,50\pm7,45\%$, $P<0,05$) (Fig. 27B).

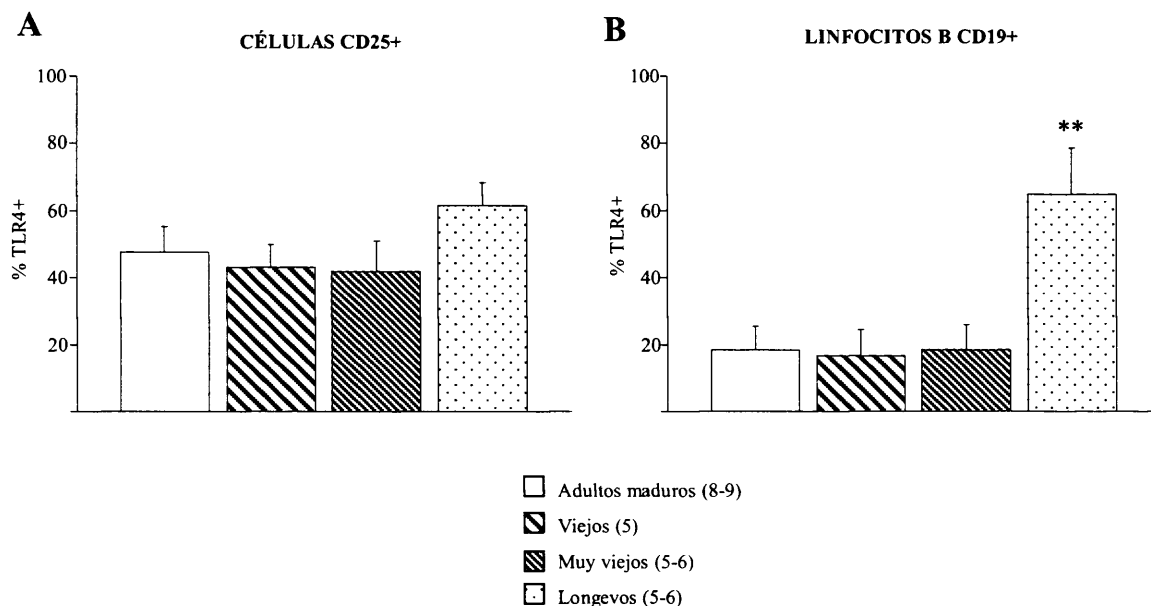


Figura 27. Porcentaje de células CD25 y CD19 que expresan el receptor Toll 4 (TLR4) en membrana (% TLR4+) en la población total de células CD25 (A) y CD19 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

En relación al **TLR2 en macrófagos**, se observó un efecto general muy significativo del envejecimiento ($P<0,01$) en el porcentaje de células CD11b⁺-TLR2⁺, que fue mayor en el peritoneo de los muy viejos ($87,45\pm4,86\%$, $P<0,05$) y también en el de longevos ($87,40\pm3,27\%$, $P<0,01$), con respecto a los adultos ($68,64\pm4,96\%$). Los viejos mostraron una cantidad relativa de células CD11b⁺ positivas para TLR2 ($82,40\pm2,96\%$) más similares a éstos (Fig. 28A). La edad también tuvo un efecto global sobre la población relativa de **células dendríticas positiva para TLR2** ($P<0,05$). Los muy viejos ($95,44\pm1,22\%$) tuvieron mayores ($P<0,05$) valores que los viejos ($76,68\pm3,99\%$), y esa misma tendencia ($P=0,088$) mostraron con respecto a los adultos ($81,28\pm4,80\%$). En longevos se observaron porcentajes más preservados ($90,82\pm3,88\%$) (Fig. 28B).

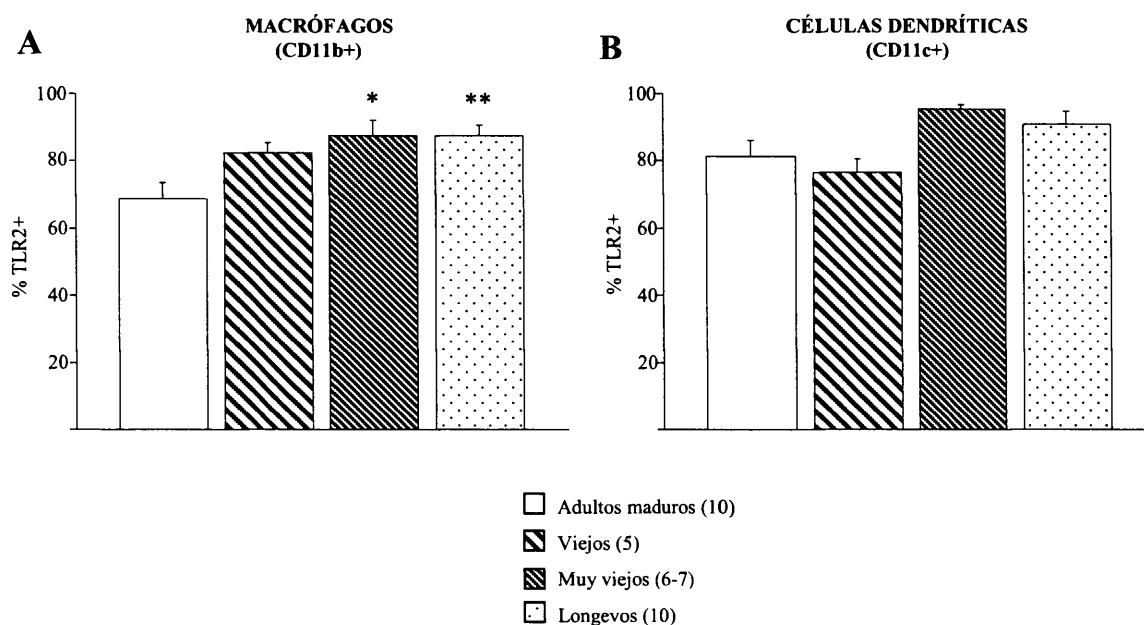


Figura 28. Porcentaje de células CD11b y CD11c que expresan el receptor Toll 2 (TLR2) en membrana (% TLR2+) en la población total de células CD11b (A) y CD11c (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

En cuanto al **TLR4 en macrófagos**, de nuevo, como sucedió con TLR2, se observó un efecto general muy significativo del envejecimiento ($P < 0,01$) en el porcentaje de células CD11b+TLR4+, que fue mayor en el peritoneo de los longevos ($53,80 \pm 4,69$ %) con respecto a adultos ($35,50 \pm 2,30$ %, $P < 0,01$) y viejos ($35,35 \pm 4,59$ %, $P < 0,05$). Los muy viejos mostraron una cantidad relativa de células CD11b+ positivas para TLR4 ($46,45 \pm 5,15$ %) más similares a éstos (Fig. 29A). No se observaron cambios en la población relativa de **células dendríticas positiva para TLR4** a lo largo de la edad. De esta forma, adultos ($71,01 \pm 4,12$ %), viejos ($66,42 \pm 6,19$ %), muy viejos ($80,65 \pm 5,58$ %) y longevos ($78,47 \pm 5,09$ %) tuvieron porcentajes similares de células CD11c+TLR4+ (Fig. 29B).

- **Citoquinas proinflamatorias y quimioquinas**

En la figura 30 se muestran los niveles de **citoquinas proinflamatorias** IL-1 α / β , IL-3 e IL-6, mientras que en la figura 31 pueden observarse los resultados correspondientes a los valores de citoquinas proinflamatorias IL-12 p40 / p70, IFN- γ y TNF- α , en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados, y estimulados con LPS y ConA.

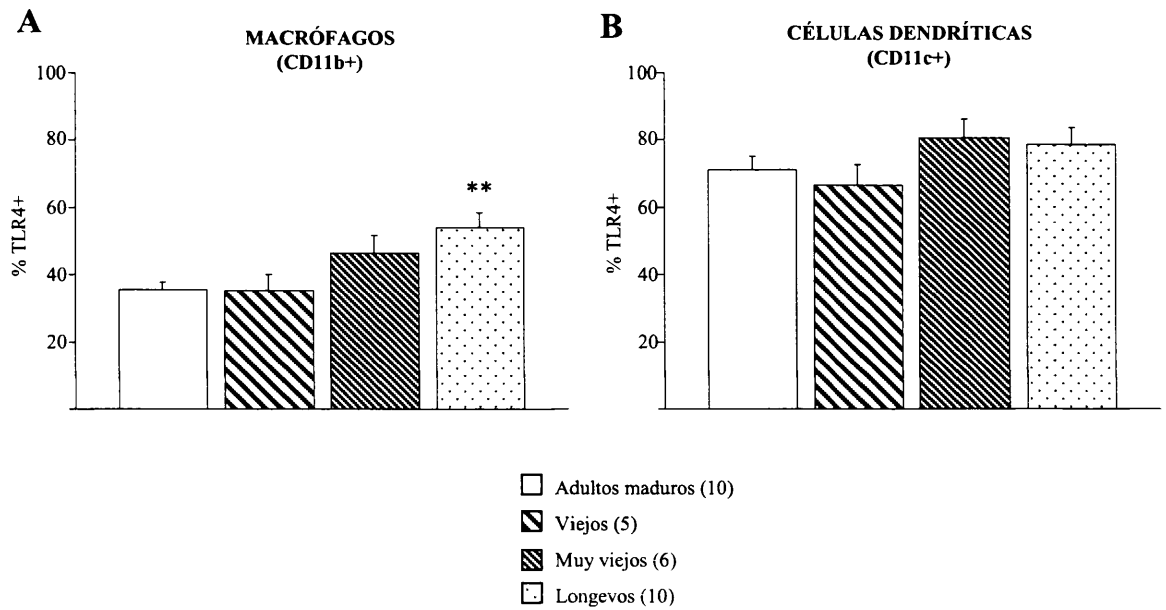


Figura 29. Porcentaje de células CD11b y CD11c que expresan el receptor Toll 4 (TLR4) en membrana (% TLR4+) en la población total de células CD11b (A) y CD11c (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

La edad produjo un efecto general en los niveles basales de todas ellas ($P < 0,001$ para IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α ; $P < 0,01$ para IL-1 α , IL-3, IL-12 p40; $P < 0,05$ para IL-12 p70). También, la edad tuvo un efecto general sobre los niveles estimulados en presencia de LPS ($P < 0,001$ para IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α ; $P < 0,01$ para IL-1 α , IL-6; $P < 0,05$ para IL-1 β) o de ConA ($P < 0,001$ para IL-1 α , IL-1 β , IL-12 p40, IFN- γ , TNF- α ; $P < 0,01$ para IL-3; $P < 0,05$ para IL-6, IL-12 p70) de la mayoría de estas citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, no todas ellas se vieron afectadas en dichos casos, ni lo hicieron del mismo modo o magnitud. En general, se observó que los longevos mostraron niveles más similares a los de los adultos que viejos y muy viejos.

Con respecto a la IL-1 α (Tabla 14 y Fig. 30A) en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos en condiciones basales, se observó una tendencia hacia valores menores en viejos y sin embargo aumentados en muy viejos en relación a los adultos, diferencia que se hizo significativa en presencia de estímulo. Así, los sobrenadantes de cultivo de leucocitos de ratones muy viejos estimulados con LPS mostraron mayores ($P < 0,01$) niveles de IL- α que los de los adultos. No obstante, en este caso sólo se apreció también una tendencia hacia la disminución en viejos. Con ConA, los niveles de IL-1 α fueron menores en viejos y

mayores en muy viejos ($P<0,05$) con respecto a los adultos. Los longevos mostraron niveles de IL-1 α más próximos a los de los adultos en todos los casos.

La IL-1 β (Tabla 14 y Fig. 30B) se vio aumentada ($P<0,001$) en condiciones basales en viejos y muy viejos con respecto a los adultos. También en presencia de LPS, ambos viejos y muy viejos mostraron mayores ($P<0,05$) niveles de IL-1 β que los adultos. No obstante, en presencia de ConA, sólo los muy viejos y no los viejos presentaron mayores ($P<0,05$) niveles de esta citoquina que los adultos. Los longevos mostraron niveles similares de IL-1 β a los de los adultos en todas las condiciones experimentales estudiadas.

Tabla 14. Niveles de IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-3 (C) e IL-6 (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

(pg/ml)	Adultos	Viejos	Muy viejos	Longevos
IL-1α				
Basal	30,95 \pm 3,37	18,43 \pm 2,98	43,13 \pm 6,53	26,79 \pm 4,14
LPS	121,8 \pm 14,67	97,69 \pm 16,53	194,38 \pm 13,13	127,83 \pm 13,44
ConA	52,94 \pm 8,78	25,76 \pm 1,44	108,85 \pm 13,20	56,34 \pm 10,76
IL-1β				
Basal	96,98 \pm 3,31	139,30 \pm 7,49	131,02 \pm 6,50	100,27 \pm 5,94
LPS	187,36 \pm 10,16	237,32 \pm 10,51	236,87 \pm 12,13	217,64 \pm 15,58
ConA	64,98 \pm 10,89	33,50 \pm 5,16	122,54 \pm 13,40	61,13 \pm 11,24
IL-3				
Basal	1,49 \pm 0,20	1,32 \pm 0,30	2,84 \pm 0,41	1,54 \pm 0,24
LPS	2,14 \pm 0,25	1,82 \pm 0,14	2,08 \pm 0,36	2,48 \pm 0,42
ConA	7,85 \pm 1,24	2,36 \pm 0,26	3,80 \pm 0,68	7,81 \pm 0,96
IL-6				
Basal	403,34 \pm 23,27	668,34 \pm 57,79	536,74 \pm 50,38	438,30 \pm 30,66
LPS	1591,06 \pm 82,69	1087,03 \pm 128,72	1097,95 \pm 145,96	1344,03 \pm 70,78
ConA	912,46 \pm 121,22	508,90 \pm 63,89	647,67 \pm 70,58	955,14 \pm 112,68

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

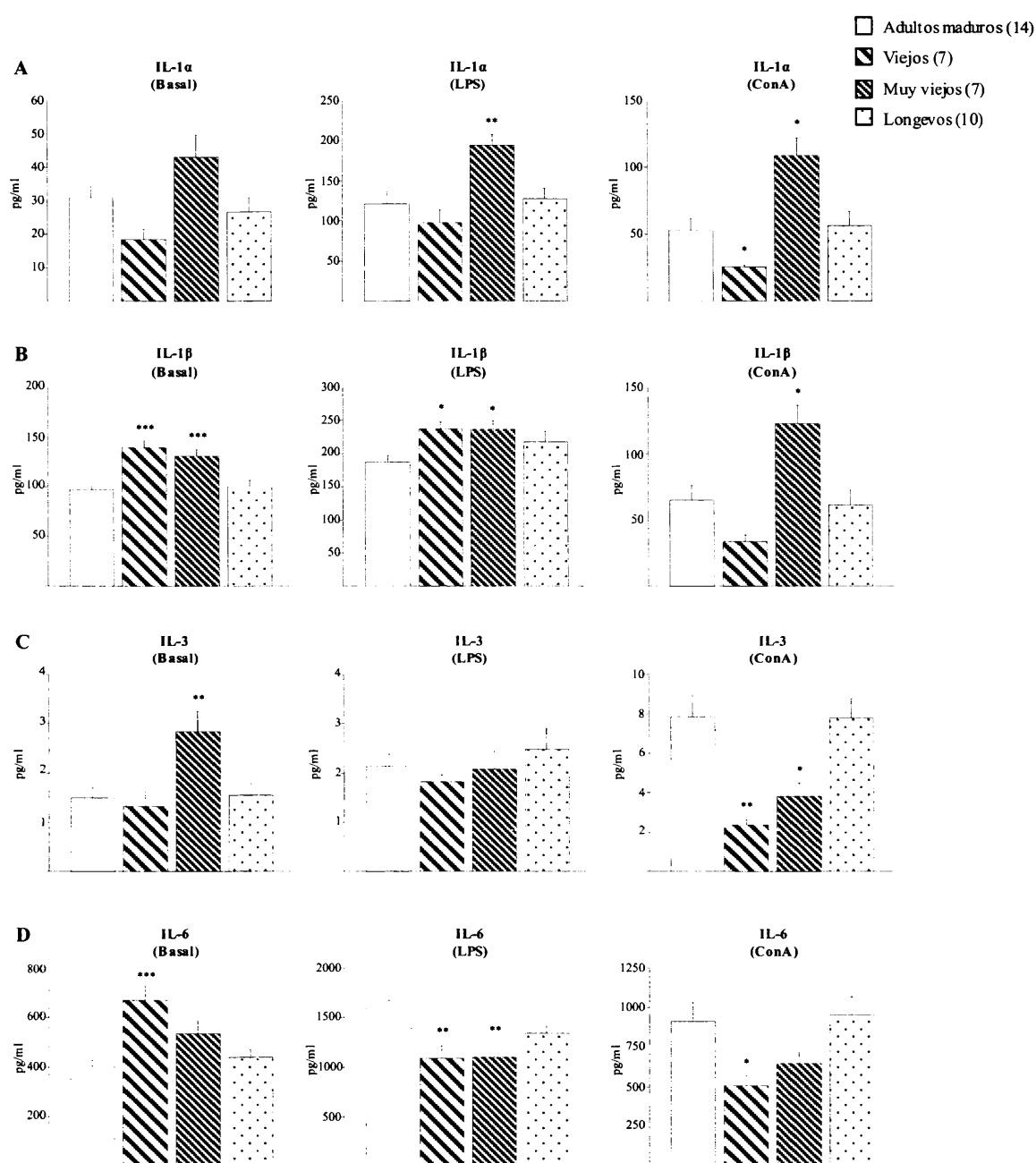


Figura 30. Niveles de IL-1α (A), IL-1β (B), IL-3 (C) e IL-6 (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

En relación a la **IL-3** (Tabla 14 y Fig. 30C), se observaron mayores ($P < 0,01$) niveles de esta citocina en condiciones basales en los muy viejos con respecto a los adultos. Los viejos y los longevos mostraron niveles similares a éstos. No hubo cambios con la edad con respecto a la etapa adulta en los niveles de IL-3 en presencia de LPS, de forma que viejos,

muy viejos y longevos presentaron niveles similares a los de los adultos. Sin embargo, tanto viejos como muy viejos mostraron menores valores de IL-3 con ConA ($P<0,01$ y $P<0,05$, respectivamente) que los adultos. De nuevo, los longevos tuvieron similares a éstos.

La **IL-6** (Tabla 14 y Fig. 30D) basal fue mayor ($P<0,001$) en viejos que en adultos. Esta misma tendencia se observó en los muy viejos, aunque en ellos no llegó a ser significativa. Sin embargo, en presencia de LPS, tanto viejos como muy viejos mostraron menores ($P<0,01$) niveles de esta citoquina que los adultos. Algo similar sucedió en presencia de ConA, dado que los viejos tuvieron valores menores ($P<0,05$) de IL-6 que los adultos, y los muy viejos mostraron la misma tendencia que aquéllos, que en su caso no fue significativa. En los longevos, se observaron niveles de IL-6 similares a los de los adultos para las tres condiciones experimentales estudiadas.

La subunidad **p40 de la IL-12** (Tabla 15 y Fig. 31A) mostró mayores niveles en los longevos que en los adultos, tanto en estado basal ($P<0,05$) como en presencia de los estímulos LPS ($P<0,05$) y ConA ($P<0,01$). No se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto a la etapa adulta para ninguna de las tres condiciones experimentales estudiadas ni en viejos ni en muy viejos. No obstante, los valores del receptor soluble de la IL-12 tendieron a ser más bajos en la vejez que en la etapa adulta, de forma que la IL-12 p40 pareció seguir un remodelado opuesto en viejos y muy viejos con respecto a los longevos. De este modo, las diferencias fueron mayores al comparar los viejos con los longevos en presencia de ConA ($P<0,001$) o los muy viejos con los longevos tanto en estado basal ($P<0,01$) como en respuesta a LPS ($P<0,001$), que las observadas en la comparación de adultos y longevos.

Con respecto al heterodímero **p70 que forma la IL-12 activa** (Tabla 15 y Fig. 31B), se observó un aumento ($P<0,05$) de sus niveles en condiciones basales en viejos con respecto a los adultos. Los individuos muy viejos y los longevos presentaron niveles similares a los de éstos. Viejos, muy viejos y longevos mostraron niveles similares de IL-12 p70 en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales en presencia de LPS a los de los adultos. En el caso del estímulo ConA, se observó un perfil contrario a la condición basal, de forma que los viejos presentaron valores menores ($P<0,05$) que los adultos. No obstante, muy viejos y longevos mostraron de nuevo niveles similares a los de éstos.

El **IFN- γ** (Tabla 15 y Fig. 31C) se vio aumentado ($P<0,05$) en condiciones basales en los muy viejos con respecto a los adultos, mostrando viejos y longevos niveles preservados. Con el estímulo LPS, los viejos presentaron menores ($P<0,01$) valores que los

adultos. No se observaron diferencias significativas en el caso de los muy viejos ni en el de los longevos, si bien aquéllos siguieron mostrando una tendencia al aumento. De este modo, las diferencias significativas aparecieron al comparar los muy viejos y los longevos entre sí ($P<0,05$), lo que podría indicar un remodelado opuesto en el IFN- γ entre ambas edades. Un perfil similar se observó para el estímulo ConA, de modo que los viejos tuvieron niveles más bajos ($P<0,01$) que los adultos. De nuevo, los muy viejos mostraron una tendencia al aumento y los longevos unos niveles más próximos a los de los adultos.

Tabla 15. Niveles de IL-12 (p40) (A), IL-12 (p70) (B), IFN- γ (C) y TNF- α (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

(pg/ml)	Adultos	Viejos	Muy viejos	Longevos
IL-12 p40				
Basal	5,55 \pm 0,61	6,65 \pm 0,53	4,45 \pm 0,75**	7,72 \pm 0,48
LPS	8,00 \pm 0,48	8,46 \pm 0,57	6,09 \pm 0,74***	9,93 \pm 0,32
ConA	6,41 \pm 0,67	5,12 \pm 0,21***	6,81 \pm 0,49	9,87 \pm 0,49
IL-12 p70				
Basal	30,10 \pm 2,52	48,11 \pm 5,57	34,53 \pm 3,92	31,01 \pm 4,50
LPS	64,65 \pm 3,62	60,45 \pm 4,06	59,60 \pm 3,68	59,71 \pm 5,21
ConA	46,40 \pm 0,40	31,42 \pm 3,12	47,94 \pm 1,96	46,58 \pm 3,22
IFN-γ				
Basal	3,16 \pm 0,52	3,23 \pm 0,47	8,86 \pm 1,35	3,15 \pm 0,53
LPS	37,00 \pm 5,97	10,16 \pm 2,38	66,04 \pm 12,39*	18,94 \pm 4,91
ConA	261,82 \pm 56,21	40,55 \pm 7,50	483,35 \pm 87,02	341,59 \pm 51,27
TNF-α				
Basal	22,05 \pm 2,50	41,67 \pm 5,29	57,60 \pm 7,56	37,50 \pm 4,83
LPS	132,02 \pm 7,77	70,20 \pm 5,80	114,25 \pm 4,77	130,02 \pm 7,61
ConA	94,2 \pm 10,67	37,59 \pm 7,56	78,85 \pm 7,91	105,97 \pm 10,77

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad longeva.

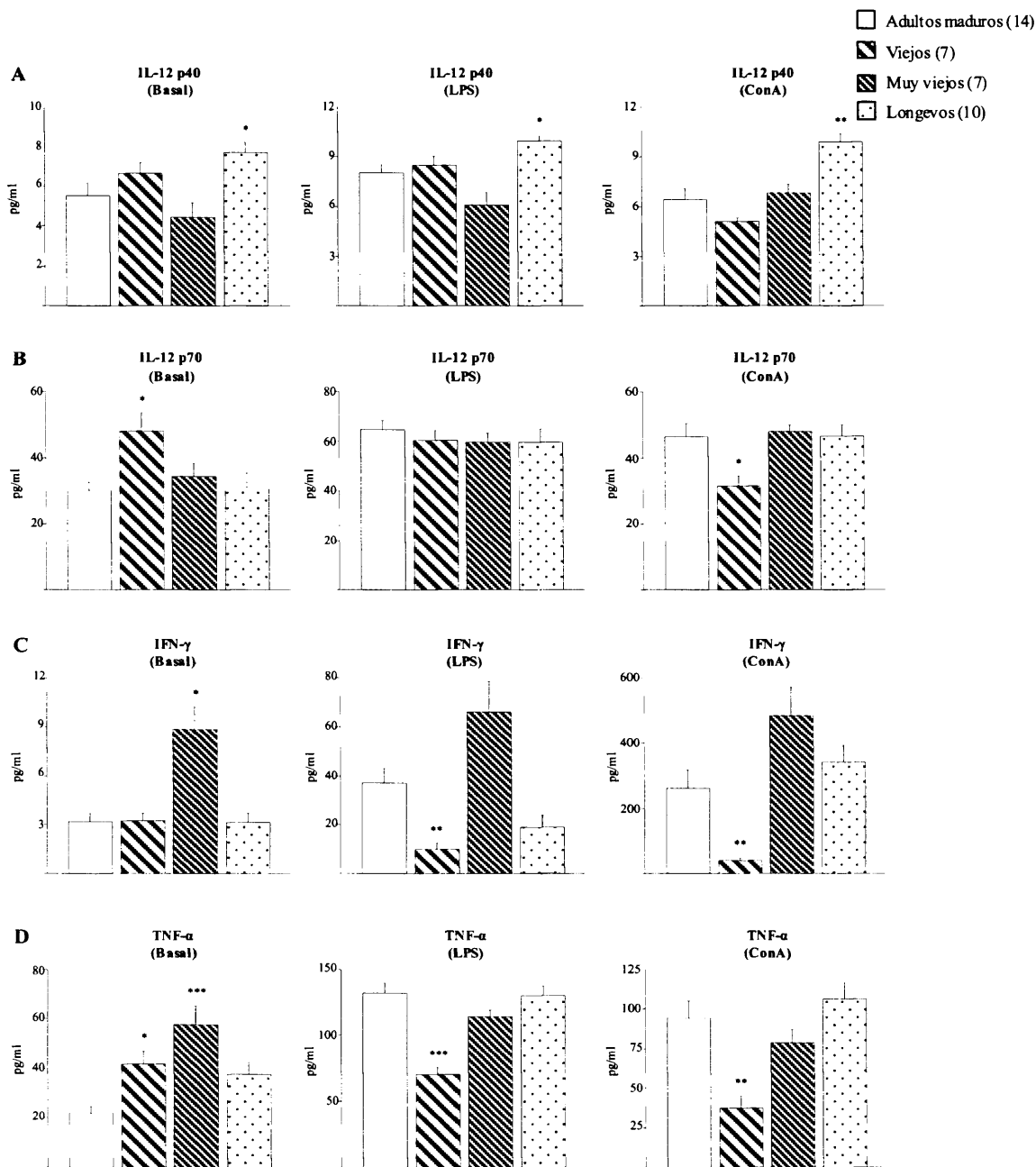


Figura 31. Niveles de IL-12 (p40) (A), IL-12 (p70) (B), IFN- γ (C) y TNF- α (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Por último, los niveles basales de **TNF- α** (Tabla 15 y Fig. 31D) aparecieron aumentados en viejos ($P < 0,05$) y más aún en muy viejos ($P < 0,001$) con respecto a los adultos. Sin embargo, los viejos mostraron menores niveles de esta citoquina en presencia del estímulo LPS ($P < 0,001$) y de ConA ($P < 0,01$) que los adultos. Los muy viejos

presentaron unos niveles estimulados de TNF- α más preservados. Por otra parte, los longevos tuvieron unos niveles de TNF- α similares a los de los adultos para las tres condiciones experimentales estudiadas. Los niveles de TNF- α en sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales en presencia de LPS fueron determinados, no sólo a través de luminometría, sino también mediante ELISA, que corroboró los resultados descritos con anterioridad. Así, los viejos ($240,42 \pm 15,16$ pg/ml) mostraron valores menores ($P < 0,001$) de esta citoquina que los adultos ($471,63 \pm 41,37$ pg/ml), mientras que muy viejos ($473,79 \pm 23,21$ pg/ml) y longevos ($484,92 \pm 55,69$ pg/ml) tuvieron niveles más preservados.

En la figura 32 se muestran los niveles de las **quimioquinas** KC, MCP-1, MIP-1 β y RANTES en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados, y estimulados con LPS y ConA.

La edad produjo un efecto general en los niveles basales de KC ($P < 0,001$) y MIP-1 β ($P < 0,05$). En presencia de LPS, se vieron afectados los niveles de dichas quimioquinas y de RANTES ($P < 0,001$) en función de la edad. Existió también un efecto general de la edad para los niveles de MCP-1 ($P < 0,001$), KC y MIP-1 β ($P < 0,01$) ante el estímulo ConA. En general, los longevos mostraron unos valores más próximos a los de los adultos en los niveles de todas ellas que viejos y muy viejos, si bien tendieron a la disminución en todas las edades estudiadas.

Con respecto a los niveles de **KC** (Tabla 16 y Fig. 32A), en condiciones basales se observó una tendencia hacia su disminución en viejos con respecto a los adultos, que se hizo altamente significativa ($P < 0,001$) en muy viejos y longevos. Los leucocitos de los muy viejos presentaron también menores ($P < 0,001$) niveles de KC en presencia de LPS que los adultos, mientras que viejos y longevos fueron capaces de responder adecuadamente al estímulo. En el caso de ConA, tanto viejos como muy viejos y longevos presentaron valores menores ($P < 0,05$) que los adultos.

Por otra parte, los niveles de **MCP-1** (Tabla 16 y Fig. 32B) no cambiaron en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos no estimulados, apareciendo similares en viejos, muy viejos y longevos a los de los adultos. Los viejos presentaron valores menores ($P < 0,05$) de esta quimioquina en respuesta a los estímulos LPS y ConA que los adultos, mientras que los muy viejos y los longevos mostraron una respuesta a estímulo más preservada.

Los niveles basales de **MIP-1 β** (Tabla 16 y Fig. 32C) mostraron una tendencia hacia la disminución en viejos, que se hizo significativa ($P < 0,05$) en muy viejos y longevos, en

comparación con los adultos. En respuesta a LPS, los valores de MIP-1 β fueron menores ($P<0,001$) en viejos, muy viejos y longevos en relación a los adultos. Sin embargo, los longevos presentaron unos valores de MIP-1 β similares a los de los adultos en respuesta a ConA, mientras que aparecieron disminuidos en viejos ($P<0,01$) y muy viejos ($P<0,05$).

Finalmente, los niveles de **RANTES** (Tabla 16 y Fig. 32D) no cambiaron a lo largo de la edad en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos no estimulados o estimulados con ConA, apareciendo similares a los de los adultos en viejos, muy viejos y longevos. No obstante, se observó una tendencia a la disminución en estado basal con la edad, que se dio también en presencia de ConA, si bien los longevos presentaron niveles más próximos a los de los adultos. Los niveles de RANTES en respuesta a LPS fueron menores ($P<0,01$) en longevos que en adultos, estando aún más bajos ($P<0,001$) en viejos y muy viejos.

Tabla 16. Niveles de KC (A), MCP-1 (B), MIP-1 β (C) y RANTES (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

(pg/ml)	Adultos	Viejos	Muy viejos	Longevos
KC				
Basal	7031,47 \pm 317,39	5110,58 \pm 764,56	2453,59 \pm 279,39	2336,81 \pm 234,82
LPS	13239,72 \pm 788,99	13683,43 \pm 1492,30	5366,43 \pm 709,67	14304,05 \pm 1022,31
ConA	6917,39 \pm 625,59	4106,65 \pm 526,24	4121,98 \pm 486,14	4573,53 \pm 556,03
MCP-1				
Basal	178,09 \pm 22,34	194,70 \pm 20,75	212,37 \pm 20,74	163,43 \pm 19,52
LPS	660,33 \pm 109,69	319,07 \pm 46,69	553,49 \pm 70,22	666,73 \pm 71,93
ConA	318,09 \pm 39,29	187,22 \pm 25,78	403,65 \pm 35,22	528,44 \pm 72,59
MIP-1β				
Basal	530,20 \pm 66,86	455,82 \pm 81,35	315,41 \pm 40,68	297,26 \pm 22,94
LPS	984,96 \pm 71,37	529,05 \pm 69,92	346,84 \pm 34,19	403,14 \pm 33,70
ConA	1136,12 \pm 107,91	556,94 \pm 63,77	599,53 \pm 70,35	936,57 \pm 133,31
RANTES				
Basal	296,77 \pm 59,02	195,68 \pm 30,19	200,09 \pm 42,30	183,24 \pm 34,62
LPS	1226,04 \pm 113,58	600,32 \pm 40,27	457,42 \pm 120,59	726,97 \pm 55,45
ConA	524,39 \pm 82,85	421,17 \pm 85,88	497,85 \pm 62,68	555,54 \pm 77,75

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

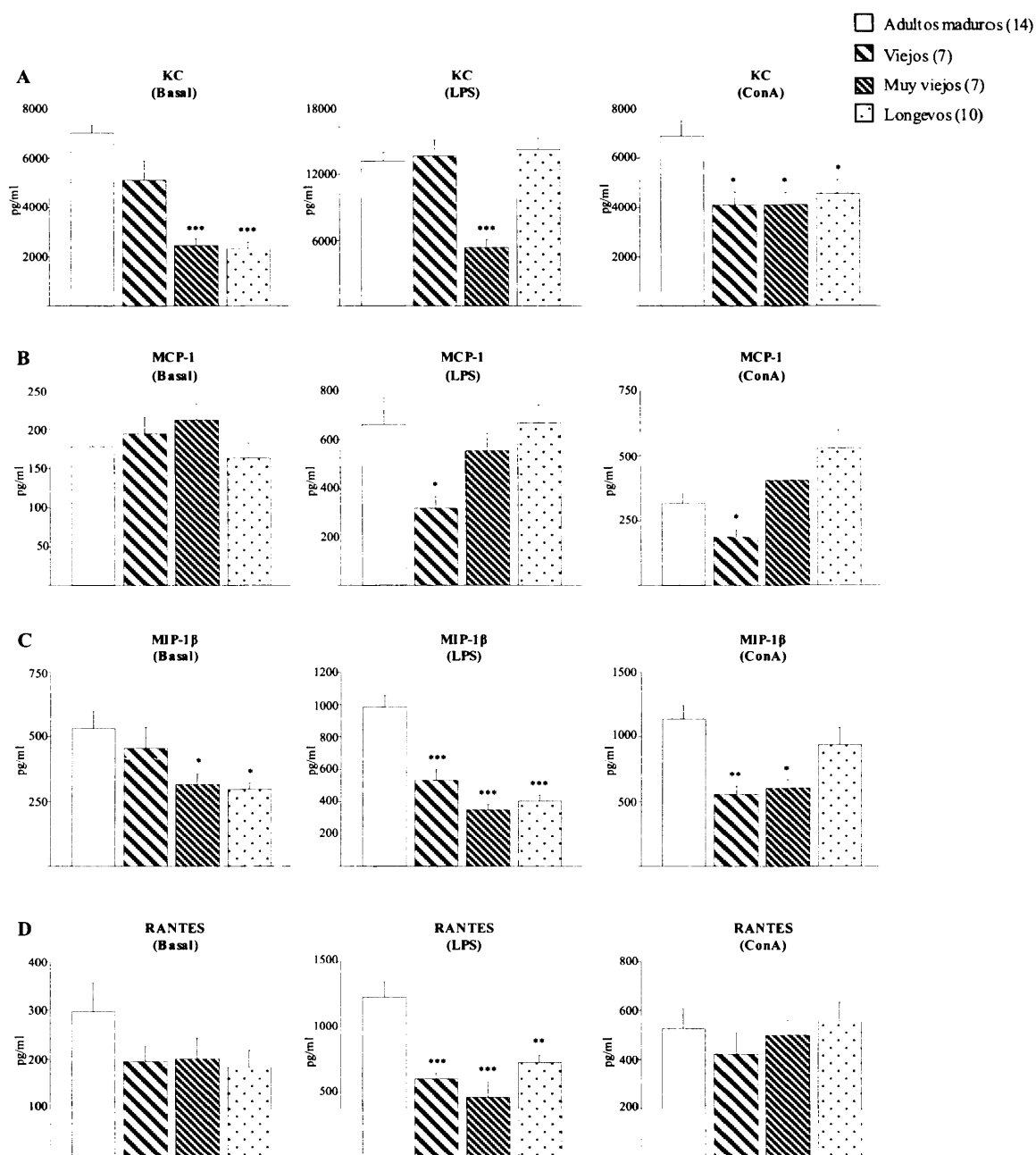


Figura 32. Niveles de KC (A), MCP-1 (B), MIP-1β (C) y RANTES (D) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Defensas antioxidantes y anti-inflamatorias

- ***Antioxidantes: Niveles de glutathion total, y actividades glutathion peroxidasa y catalasa***

Se observó un efecto general de la edad disminuyendo el contenido en glutathion (GSH) intracelular de leucocitos peritoneales murinos, así como la actividad de las defensas antioxidantes enzimáticas glutathion peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) ($P<0,001$) (Fig. 33).

Los valores de **GSH** (Fig. 33A) en leucocitos de viejos ($1,06\pm0,02$ nmol/ 10^6 leucocitos) disminuyeron muy significativamente ($P<0,001$) con respecto a los adultos ($0,73\pm0,03$ nmol/ 10^6 leucocitos), mientras que aparecieron preservados en muy viejos ($1,08\pm0,11$ nmol/ 10^6 leucocitos) y en longevos ($1,17\pm0,05$ nmol/ 10^6 leucocitos).

Con respecto a la actividad **GPx** (Fig. 33B), se observó una disminución altamente significativa ($P<0,001$) en viejos (225 ± 34 mU/ 10^6 leucocitos) y en menor medida ($P<0,01$) en muy viejos (312 ± 21 mU/ 10^6 leucocitos) en relación a los adultos (447 ± 21 mU/ 10^6 leucocitos). No obstante, los individuos longevos mantuvieron la actividad de esta enzima antioxidante a niveles similares a los de los animales adultos (518 ± 34 mU/ 10^6 leucocitos).

Finalmente, la actividad **CAT** (Fig. 33C) mostró una tendencia a la disminución en viejos (23 ± 2 U/ 10^6 leucocitos), que fue significativa ($P<0,05$) en muy viejos (18 ± 1 U/ 10^6 leucocitos), en relación a los adultos (27 ± 1 U/ 10^6 leucocitos). No obstante, los longevos presentaron mayor ($P<0,01$) actividad de la enzima que éstos (36 ± 3 U/ 10^6 leucocitos).

- ***Citoquinas antiinflamatorias***

En la tabla 17 y la figura 34 se muestran los niveles de las citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-10 e IL-13 valorados en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados, y estimulados con LPS y ConA.

La edad produjo un efecto general en los niveles basales de IL-10 e IL-13 ($P<0,001$), mientras que todas ellas se vieron afectadas en respuesta a LPS ($P<0,001$ para IL-13, $P<0,01$ para IL-4 y $P<0,05$ para IL-10) y ConA ($P<0,001$ para IL-13 e IL-4 y $P<0,05$ para IL-4). En general, los longevos mostraron niveles más similares a los de los adultos en las citoquinas antiinflamatorias que viejos y muy viejos, que mostraron valores más bajos.

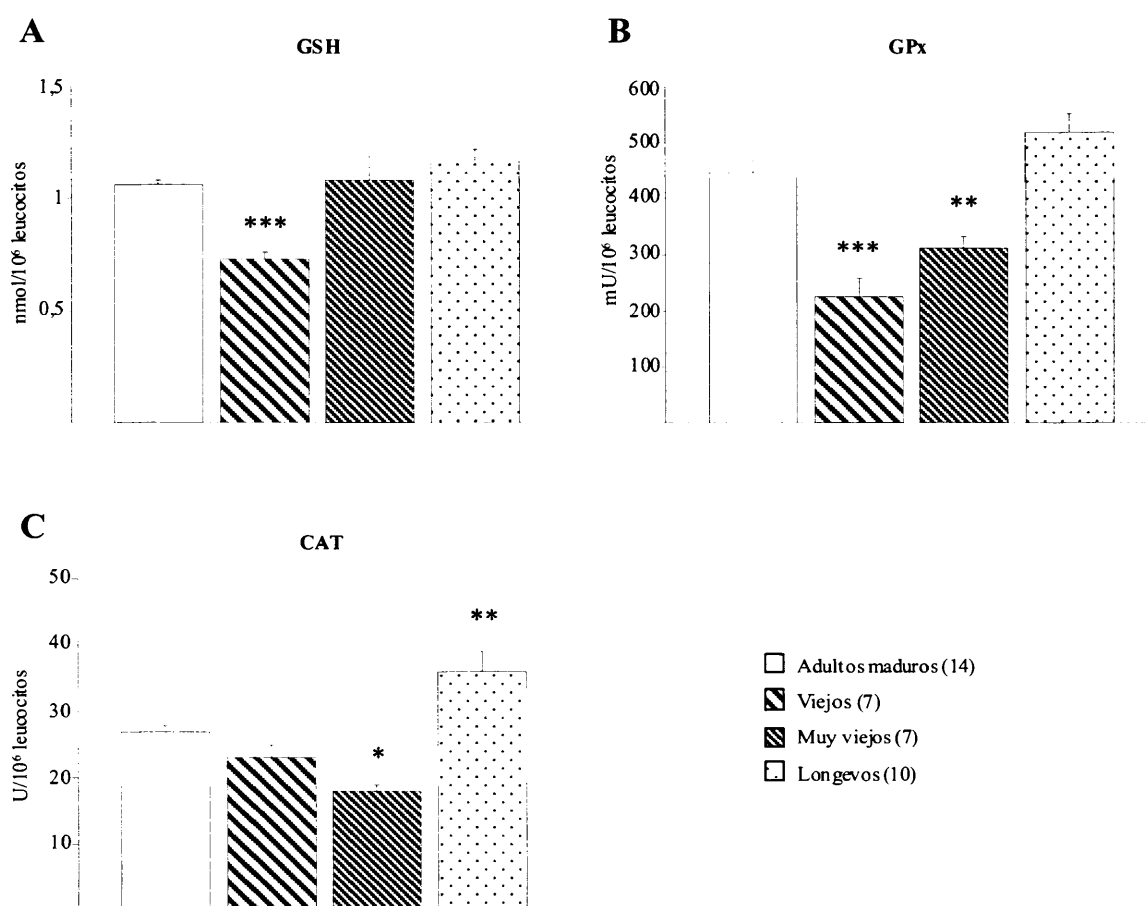


Figura 33. Valores de glutatión (GSH) (nmol/10⁶ leucocitos) (A), actividad glutatión peroxidasa (GPx) (mU/10⁶ leucocitos) (B) y actividad catalasa (CAT) (U/10⁶ leucocitos) (C) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05 con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Con respecto a los niveles de **IL-4** (Tabla 17 y Fig. 34A) en los sobrenadantes de cultivo de leucocitos en condiciones basales y estimuladas con ConA, viejos, muy viejos y longevos mostraron valores similares de IL-4 en ambas condiciones experimentales a los de los adultos. No obstante, los viejos presentaron niveles menores a los de los longevos (P <0,05), observándose esa misma tendencia en los muy viejos. La respuesta a LPS fue menor (P <0,001) en viejos que en adultos, si bien muy viejos y longevos respondieron adecuadamente al estímulo.

En viejos, los niveles de **IL-10** (Tabla 17 y Fig. 34B) fueron más bajos tanto basalmente ($P<0,001$) como en presencia de los estímulos LPS ($P<0,05$) y ConA ($P<0,001$) que los de los adultos. Los muy viejos y los longevos mostraron niveles más preservados de IL-10, si bien éstos los tuvieron aumentados ($P<0,05$) en condiciones basales con respecto a los presentes en adultos. Además, en presencia de ConA los muy viejos tendieron hacia menores valores de esta citoquina antiinflamatoria que los longevos.

Por último, se observó una tendencia hacia mayores niveles de **IL-13** (Tabla 17 y Fig. 34C) basales con la edad, que fue significativa para viejos ($P<0,01$) y longevos ($P<0,001$) pero no para muy viejos, con respecto a los adultos. Los longevos presentaron también valores mayores de IL-13 en presencia de LPS ($P<0,001$) y ConA ($P<0,05$) que los adultos, mientras que viejos y muy viejos mantuvieron la respuesta a LPS al nivel de éstos, pero no la de ConA, que fue más baja ($P<0,01$ y $P<0,05$, respectivamente) que en la etapa adulta.

Tabla 17. Niveles de IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-13 (C) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

(pg/ml)	Adultos	Viejos	Muy viejos	Longevos
IL-4				
Basal	1,56±0,24	0,93±0,11*	1,25±0,26	1,59±0,18
LPS	2,69±0,25	1,47±0,09	2,43±0,19	2,48±0,10
ConA	4,14±0,68	2,44±0,61*	3,24±0,44	5,39±0,45
IL-10				
Basal	100,02±10,53	40,41±7,05	92,35±22,98	179,17±20,18
LPS	834,22±62,05	515,58±100,25	649,89±94,75	779,17±68,32
ConA	282,61±32,6	78,99±9,93	210,08±19,49	293,5±24,23
IL-13				
Basal	2,43±0,32	3,97±0,25	3,02±0,65	6,60±0,36
LPS	7,41±0,45	7,67±0,91	6,77±0,88	13,33±0,69
ConA	14,68±2,09	6,25±0,96	7,64±0,79	26,37±2,71

Se muestra la media ± el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad longeva.

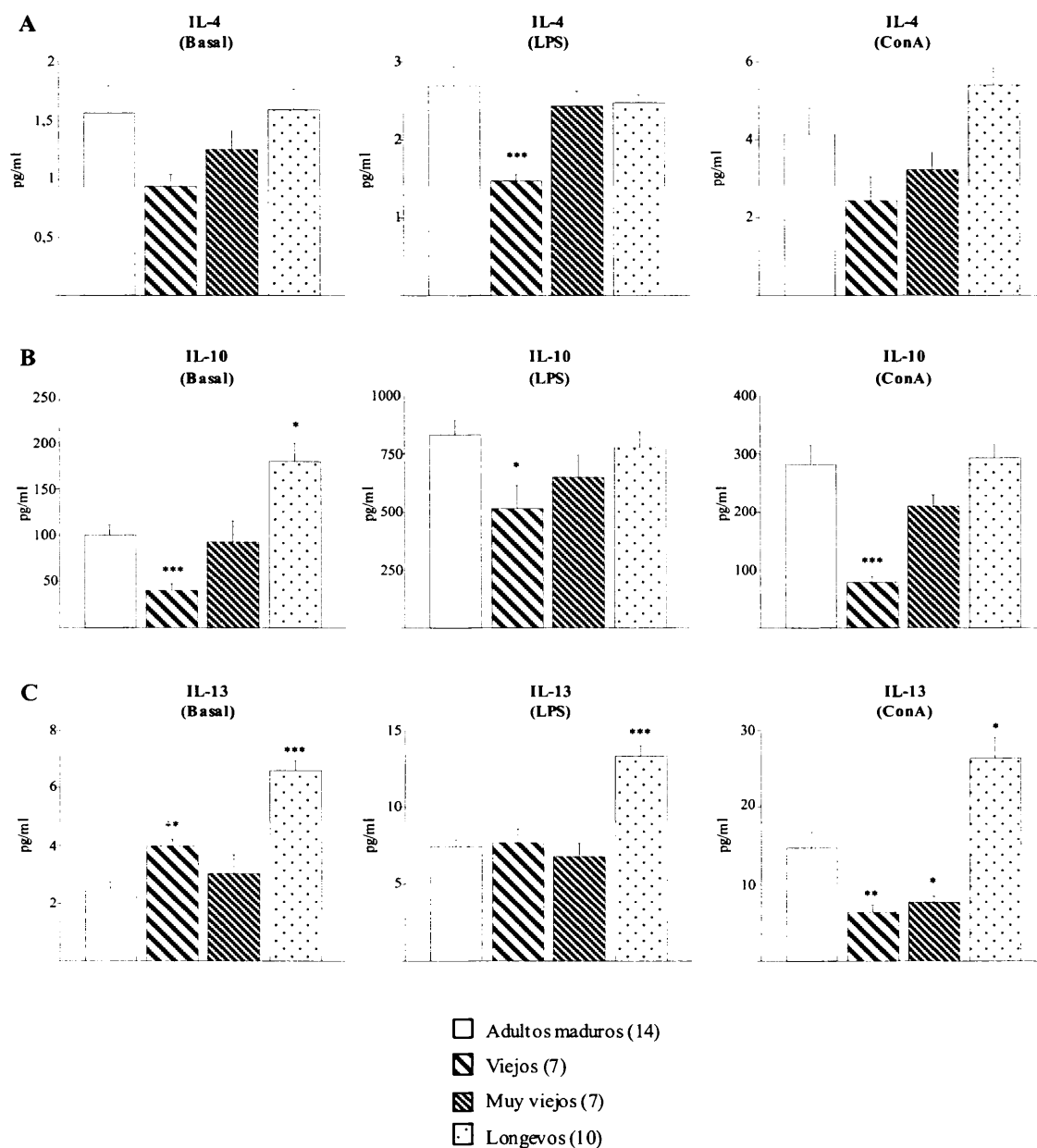


Figura 34. Niveles de IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-13 (C) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de leucocitos peritoneales murinos no estimulados (basal), y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

4.1.1.1.4. Apoptosis.

No se observó efecto de la edad en el estímulo de la apoptosis de leucocitos peritoneales murinos en presencia de H_2O_2 . De esta forma, se encontraron valores similares en adultos (96 ± 2 %), viejos (101 ± 1 %), muy viejos (101 ± 2 %) y longevos (101 ± 1 %).

4.1.1.2. Estudio neurológico en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.

Los animales fueron sometidos a estudios de neuroimagen por resonancia magnética y se cuantificó la intensidad de la señal ponderada en T2 (tiempo que tarda la magnetización transversal en descender en un 63% de su fuerza máxima o, lo que es igual, persiste un 37%) en distintas áreas cerebrales de especial relevancia por las funciones que coordinan; corteza cingular, amígdala, hipocampo, corteza entorrinal, corteza somatosensorial, y corteza motora. Los resultados se muestran en la tabla 18. Con el envejecimiento, se observó una tendencia hacia menores valores de T2, fundamentalmente en corteza entorrinal ($P=0,078$) y corteza somatosensorial ($P=0,097$).

Tabla 18. Intensidad de la señal ponderada en T2 (ms) en distintas regiones cerebrales de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, muy viejos y longevos.

T2 (ms)	Adultos	Viejos	Muy Viejos	Longevos
CC	66,18 \pm 1,70	64,69 \pm 2,12	65,48 \pm 0,97	62,37 \pm 4,34
Amg	72,61 \pm 1,55	75,78 \pm 1,69	72,33 \pm 1,76	71,33 \pm 4,28
HipC1	63,82 \pm 1,22	67,80 \pm 1,71	61,07 \pm 2,66	64,30 \pm 4,81
HipC2	64,74 \pm 1,43	70,10 \pm 1,65	67,27 \pm 1,39	69,55 \pm 7,49
HipC3	67,03 \pm 1,09	67,79 \pm 1,76	69,19 \pm 0,83	61,61 \pm 4,66
CEtr	69,14 \pm 2,03	76,99 \pm 1,30	65,51 \pm 1,22	72,32 \pm 3,14
CSS	67,09 \pm 1,08	65,52 \pm 2,06	65,63 \pm 0,76	60,64 \pm 3,33
CM	68,12 \pm 1,13	67,64 \pm 2,69	68,23 \pm 0,97	62,39 \pm 4,38

Se muestra la media \pm el error estándar de 4-16 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (15-16 adultos; 5 viejos; 4 muy viejos; 6 longevos). Los muy viejos tendieron hacia menores valores de T2 que los viejos en CEtr ($P=0,083$); los longevos tendieron hacia menores valores de T2 que los adultos en CSS ($P=0,061$). CC = corteza cingular; Amg = amígdala; HipC1, 2, 3 = hipocampo corte 1, 2, 3; CEtr = corteza entorrinal; CSS = corteza somatosensorial; CM = corteza motora.

Además, en general, las áreas hiperintensas, que se corresponden con líquido cefalorraquídeo y representan atrofia cerebral, fueron más pronunciadas en los animales de mayor edad (Fig. 35B) que en los adultos (Fig. 35A).

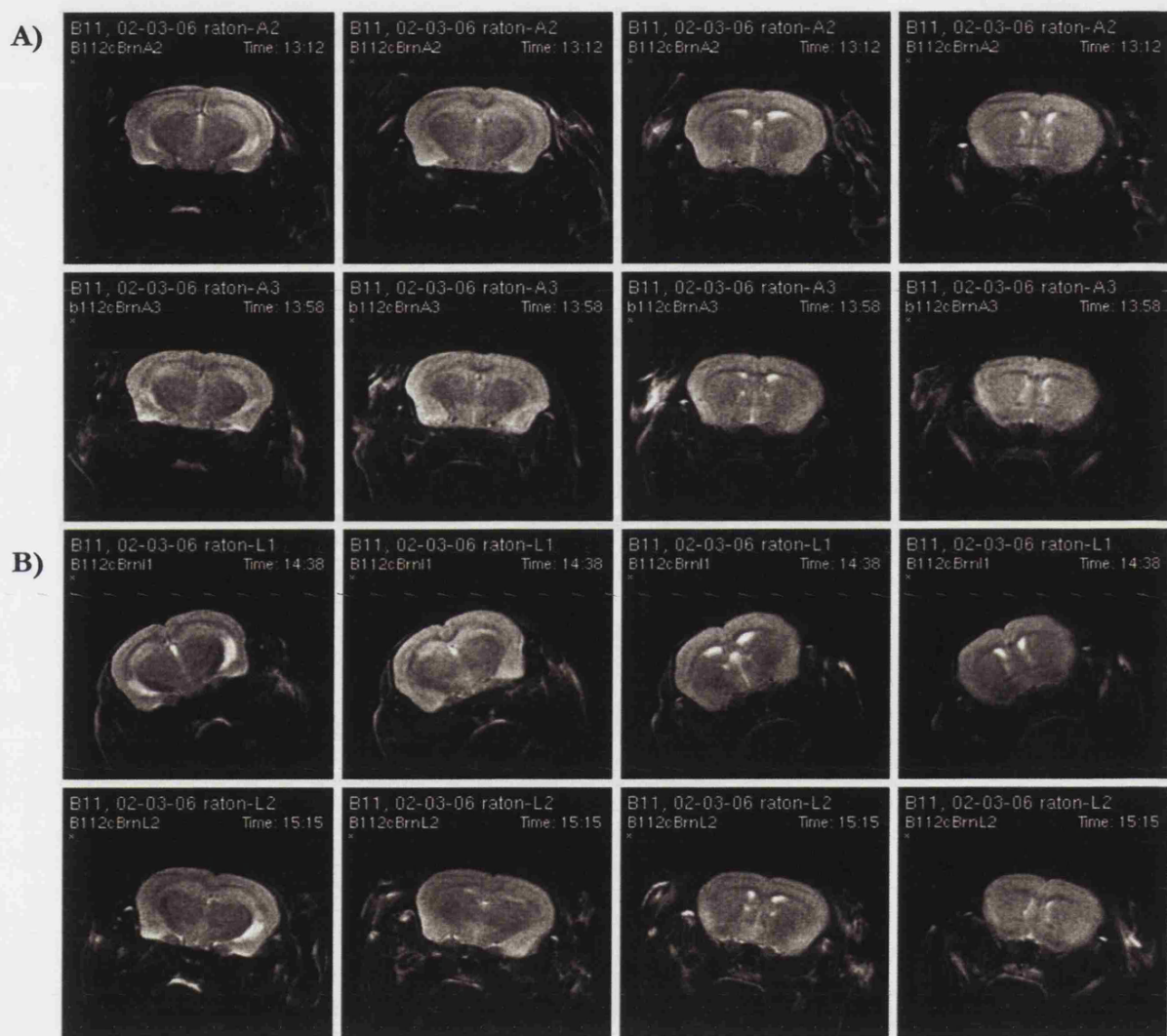


Figura 35. Imágenes coronales ponderadas en T2 con supresión de grasa para 4 cortes contiguos de cerebro de 2 ratones hembras ICR/CD1 adultos (A) y 2 longevos (B). Las áreas brillantes de alta señal se corresponden con líquido cefalorraquídeo y son representativas de atrofia cerebral. Estas áreas hiperintensas son más pronunciadas en los animales de mayor edad que en los adultos.

4.1.1.3. Profundización en los cambios con la edad en el daño oxidativo a proteínas y análisis de la composición de ácidos grasos, en ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos.

4.1.1.3.1. Biomarcadores de oxidación proteica.

La Tabla 19 y la figura 36 muestran los resultados relativos a los marcadores no enzimáticos de modificación proteica en **cerebro** de ratones hembras adultos, viejos y longevos.

Tabla 19. Marcadores no enzimáticos de modificación proteica ($\mu\text{mol/mol}$ lisina) en cerebro de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos, medidos por cromatografía de gases-espectroscopía de masas.

($\mu\text{mol/mol}$ lys)	Adultos	Viejos	Longevos
GSA	5859,56 \pm 158,41	7860,10 \pm 502,12***	5528,32 \pm 194,05
AASA	186,96 \pm 6,58	209,31 \pm 7,54***	157,08 \pm 6,64
CEL	432,07 \pm 23,79	364,29 \pm 10,99*	404,72 \pm 14,73
CML	535,62 \pm 14,59	682,66 \pm 33,02***	474,46 \pm 22,39
MDAL	1458,03 \pm 172,33	2408,25 \pm 261,42**	1542,80 \pm 104,26

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad longeva. GSA = semialdehído glutámico; AASA = semialdehído aminoalípico; CEL = carboxietil-lisina; CML = carboximetil-lisina; MDAL = malondialdehído-lisina.

Los marcadores específicos de oxidación, lipoxidación y glicoxidación de proteínas, medidos por cromatografía de gases-espectroscopía de masas, mostraron en general niveles preservados en longevos con respecto a los adultos, mientras que se vieron aumentados en los viejos.

Concretamente, semialdehído glutámico (GSA), carboximetil-lisina (CML) y malondialdehído-lisina (MDAL) aumentaron significativamente en el cerebro de viejos en relación a los valores encontrados en adultos ($P<0,05$) y longevos ($P<0,001$ para GSA y CML, y $P<0,01$ para MDAL), cuyos niveles fueron similares. Los valores de semialdehído aminoalípico (AASA) observados en viejos fueron similares a los de los adultos, mientras que los longevos mostraron niveles menores en comparación con las otras dos edades ($P<0,05$ con respecto a adultos, y $P<0,001$ con respecto a viejos). Por otra parte, la

carboxietil-lisina (CEL) fue similar en adultos y longevos, mientras que los viejos mostraron niveles menores ($P<0,05$).

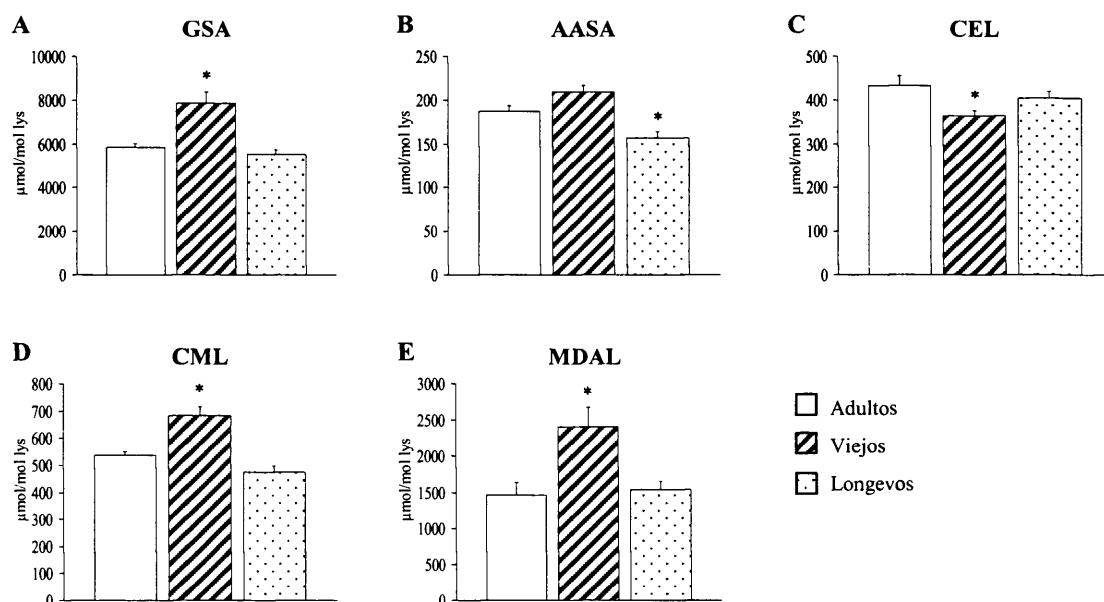


Figura 36. Semialdehído glutámico (GSA) (A), semialdehído aminoadípico (AASA) (B), carboxietil-lisina (CEL) (C), carboximetil-lisina (CML) (D), y malondialdehído-lisina (MDAL) (E) ($\mu\text{mol/mol}$ lisina) en cerebro de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos, medidos por cromatografía de gases-espectroscopía de masas. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6 adultos; 11 viejos; 8 longevos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Los cambios en los marcadores no enzimáticos de modificación proteica a lo largo de la edad fueron menos relevantes en **bazo** que los encontrados en cerebro (Tabla 20 y Fig. 37).

Tabla 20. Marcadores no enzimáticos de modificación proteica ($\mu\text{mol/mol}$ lisina) en bazo de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos, medidos por cromatografía de gases-espectroscopía de masas.

($\mu\text{mol/mol}$ lys)	Adultos	Viejos	Longevos
GSA	8521,23 \pm 489,60	10746,73 \pm 502,20**	8326,53 \pm 675,04
AASA	297,96 \pm 21,55	350,62 \pm 46,52	265,27 \pm 13,83
CEL	400,84 \pm 5,84	357,77 \pm 15,45	394,02 \pm 11,62
CML	717,24 \pm 33,73	1046,60 \pm 87,70	1063,63 \pm 78,88
MDAL	997,61 \pm 52,23	2372,05 \pm 242,12**	1355,94 \pm 170,43

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de edad longeva. GSA = semialdehído glutámico; AASA = semialdehído aminoadípico; CEL = carboxietil-lisina; CML = carboximetil-lisina; MDAL = malondialdehído-lisina.

El bazo de longevos mostró valores similares a los observados en adultos para todos los marcadores de oxidación proteica estudiados, apreciándose únicamente una tendencia al aumento en el caso de la CML ($P=0,074$). Por otra parte, el daño oxidativo a proteínas tendió a ser mayor en los viejos que en adultos y longevos ($P=0,064$ para GSA y $P=0,073$ para CML, con respecto a los adultos), hecho que se hizo significativo para los marcadores MDAL ($P<0,01$ con respecto a adultos y longevos) y GSA ($P<0,01$ con respecto a los longevos). Al igual que en cerebro, se apreció una tendencia hacia bajos niveles de CEL en viejos, que en bazo no llegó a alcanzar una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,096$ con respecto a los longevos).

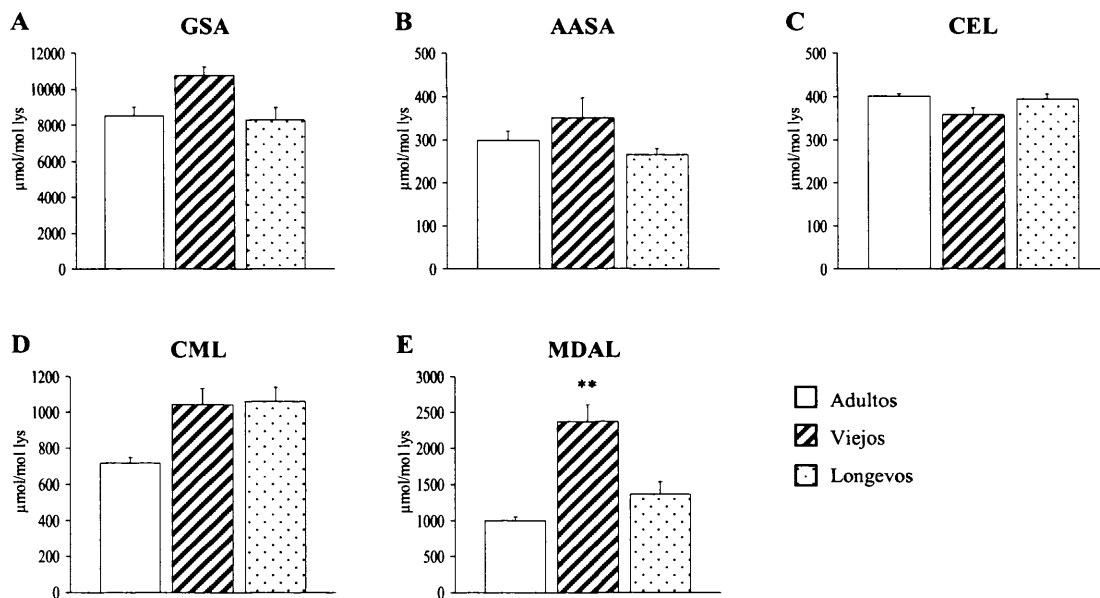


Figura 37. Semialdehído glutámico (GSA) (A), semialdehído aminoadípico (AASA) (B), carboxietil-lisina (CEL) (C), carboximetil-lisina (CML) (D), y malondialdehído-lisina (MDAL) (E) ($\mu\text{mol/mol}$ lisina) en bazo de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos, medidos por cromatografía de gases-espectroscopía de masas. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6 adultos; 10 viejos; 9 longevos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Además, varios sujetos de cada grupo de edad fueron escogidos al azar y en ellos se realizó un *western blot* para el análisis del marcador de lipoxidación proteica **MDAL**. Tanto en **bazo** como en **cerebro**, los resultados mostraron un aumento de MDAL ($P<0,05$) en viejos y en longevos con respecto a los adultos, y niveles similares del mismo en los dos grupos de edades más avanzadas (Fig. 38).

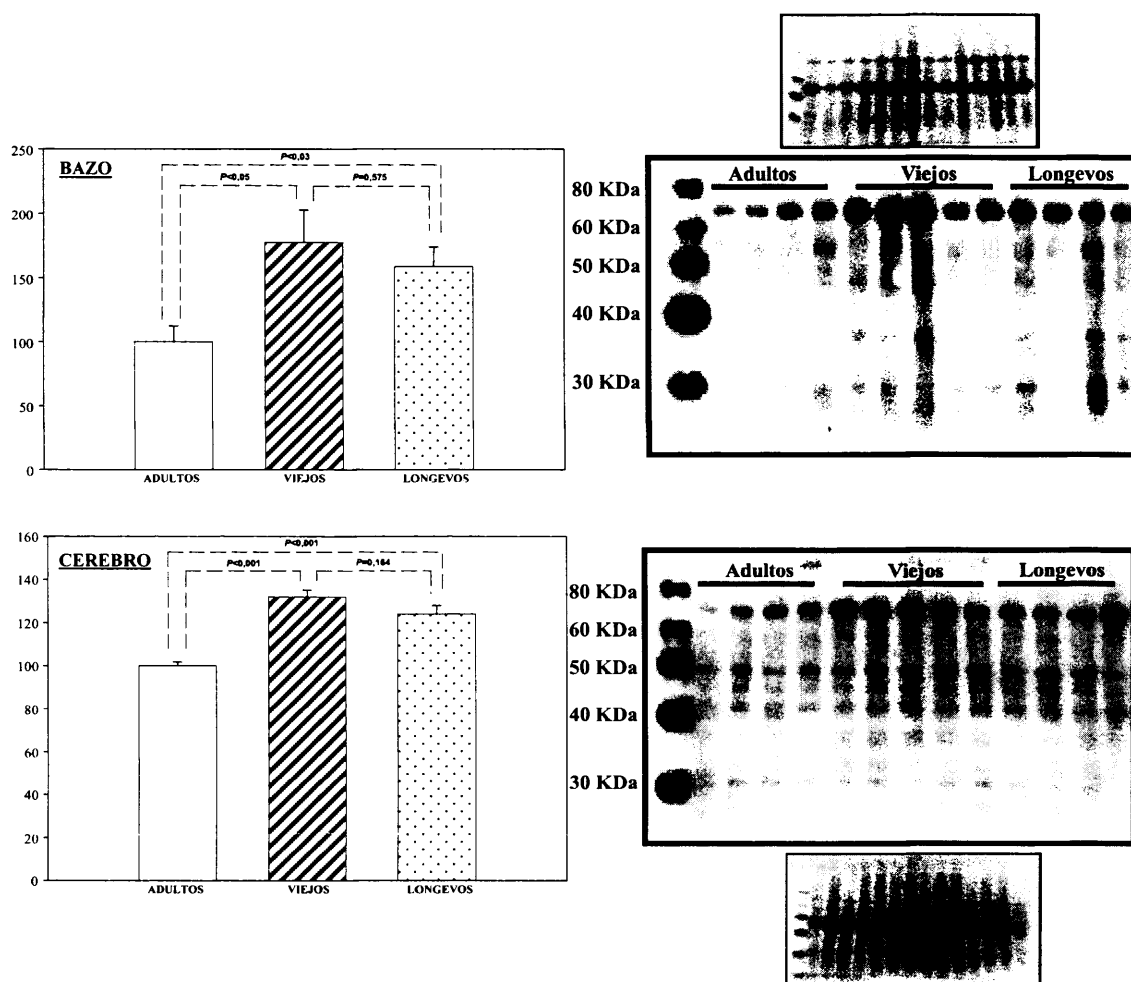


Figura 38. Malondialdehído-lisina (MDAL) en proteínas de bazo y cerebro de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Dcha.: Ejemplos de *western blots* obtenidos para anti-MDAL y sus correspondientes controles de carga con anti-actina. Izq.: Análisis densitométrico (unidades arbitrarias de densitometrado). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-5 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

También, la glucación/oxidación en el residuo lisina de las proteínas (CML) de **corazón** y **ganglios axilares** de estos mismos animales fue analizada por *western blot* (Fig. 39). Los resultados mostraron un aumento de CML en las proteínas de corazón de viejos con respecto a la edad adulta ($P < 0,05$) y longeva ($P < 0,01$), mostrando estos grupos niveles similares de dicho marcador. No se observaron cambios significativos en función de la edad con respecto a los niveles de CML en proteínas de ganglios axilares.

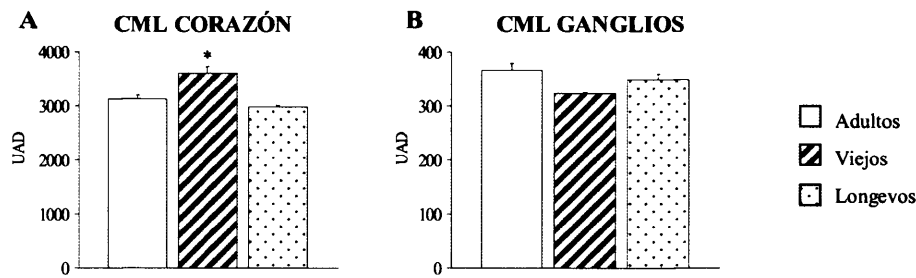


Figura 39. Carboximetil-lisina (CML) (unidades arbitrarias de densitometrado, UAD) en proteínas de corazón y ganglios axilares de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-6 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

Las muestras de corazón y ganglios de un individuo de cada grupo de edad fueron escogidas al azar, y con ellas se realizaron sendas electroforesis en dos dimensiones con el objetivo final de realizar *western blots* anti-CML de las mismas. La tinción de plata de los geles obtenidos muestra, de forma muy preliminar, que el patrón relativo de proteínas podría variar a lo largo de la edad (Fig. 40).

A continuación se realizaron *western blots* para el análisis de los residuos CML en una proteína dada, pero desafortunadamente no fue posible visualizarlos. Del *western blot* convencional, que sigue a la electroforesis en una dimensión, sabemos que son muchas las proteínas que se oxidan en el residuo lys. No obstante, cada una de ellas debe de hacerlo en bajo grado, dado que al separarlas, perdemos la capacidad de detección de CML.

4.1.1.3.2. Análisis de la composición en ácidos grasos procedentes de los lípidos totales.

En la tabla 21 se muestra el análisis de la composición de los ácidos grasos en **cerebro** de ratones hembras adultos, viejos y longevos.

Los cambios más relevantes en dicha localización a lo largo de la edad se observaron en la composición de ácidos grasos de tipo **poli-insaturado**. Así, los niveles de ácido linoleico (18:2n-6) ($P < 0,001$), estearidónico (18:4n-3) ($P < 0,05$), y docosapentanoico de la serie 3 (22:5n-3) ($P < 0,05$) disminuyeron significativamente en el cerebro de viejos con respecto a los adultos. Los longevos mantuvieron preservados los niveles de todos ellos, si bien se apreció una disminución con respecto a los adultos en el contenido de ácido linoleico (18:2n-6), que fue menor que la detectada en viejos ($P < 0,05$). Los viejos

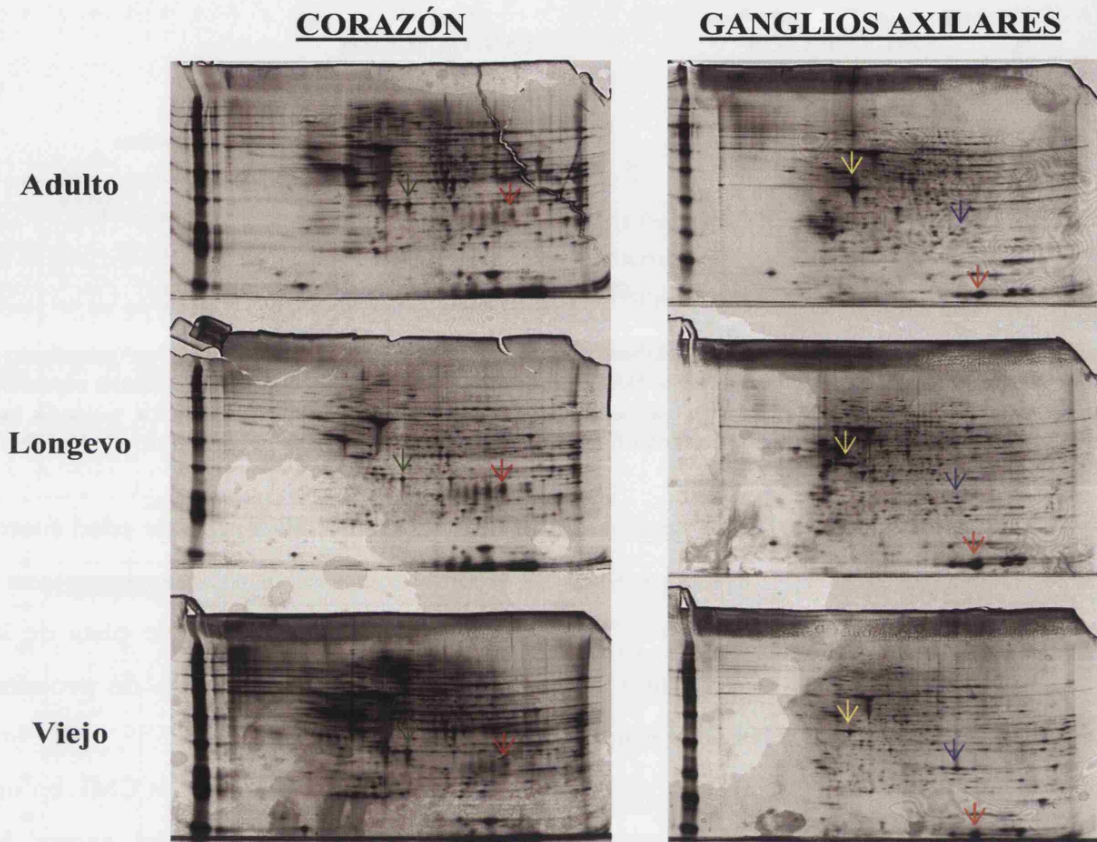


Figura 40. Tinción de plata de los geles obtenidos de electroforesis en dos dimensiones para las proteínas de corazón y de ganglios axilares procedentes de ratones hembras BALB/c adulto, viejo y longevo. Las flechas de un mismo color indican ejemplos de *spots* correspondientes a una misma proteína. Se observa que la intensidad relativa de las manchas proteicas varía con la edad.

presentaron además menor contenido en ácido eicosadienoico (20:2n-6) en cerebro que los longevos ($P < 0,05$), cuyos niveles fueron similares a los presentes en la edad adulta. No obstante, tanto viejos como longevos tuvieron menores niveles de ácido eicosapentanoico (20:5n-3) que los adultos ($P < 0,001$). Además, los longevos mostraron menores valores de ácido docosapentanoico de la serie 6 (22:5n-6) que los adultos ($P < 0,05$), y de ácido docosahexanoico (22:6n-3) que los viejos ($P < 0,001$), cuyos niveles fueron similares a los de los adultos.

Por otra parte, los ácidos grasos **mono-insaturados** palmitoleico (16:1n-7) y oleico (18:1n-9) se encontraron aumentados en el cerebro de longevos con respecto a los adultos ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente). Los viejos presentaron igual contenido de ácido palmitoleico (16:1n-7) que los adultos ($P < 0,05$ con respecto a longevos), y mayor de ácido oleico (18:1n-9) ($P < 0,001$), similar al de los longevos (Tabla 21A).

A partir de los ácidos grasos se calcularon las distintas **fracciones lipídicas**, que se muestran en la tabla 21B. La fracción total de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) fue menor en el cerebro de los longevos que en el de los adultos ($P<0,05$). No obstante, dentro de ellos, los PUFA de la familia n-3 (PUFAn-3) se vieron significativamente disminuidos en cerebro de viejos con respecto al de adultos ($P<0,05$), siendo aún menores en longevos ($P<0,01$). Por otra parte, la fracción total de ácidos grasos mono-insaturados (MUFA) se vio aumentada en éstos en relación a la edad adulta ($P<0,01$), y aún más en los viejos ($P<0,001$).

Además, la **longitud de cadena** de los ácidos grasos de los lípidos cerebrales (ACL), el **índice de dobles enlaces** (DBI), así como el **índice de peroxidizabilidad lipídica** (PI) se encontraron disminuidos en longevos con respecto a los adultos (Tabla 21C) ($P<0,01$) y a los viejos ($P<0,01$ para ACL, y $P<0,05$ para DBI y PI).

Los resultados relativos al análisis de la composición de los ácidos grasos en **bazo** de ratones hembras adultos, viejos y longevos se muestran en la tabla 22.

Con respecto a los ácidos grasos **poli-insaturados**, linoleico (18:2n-6) y estearidónico (18:4n-3) disminuyeron significativamente ($P<0,05$ y $P<0,001$, respectivamente) en el bazo de viejos mientras que araquidónico (20:4n-6) y docosahexanoico (22:6n-3) aparecieron aumentados ($P<0,05$), con respecto a los adultos.

Los longevos mantuvieron porcentajes más similares a los presentes en adultos en todos los casos, si bien pudo apreciarse una leve disminución en el contenido de ácido estearidónico (18:4n-3), que fue menor que la detectada en viejos ($P<0,05$).

Por otra parte, los ácidos grasos **mono-insaturados** palmitoleico (16:1n-7) y oleico (18:1n-9) se encontraron disminuidos en el bazo de longevos con respecto a los adultos ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente). Los viejos también presentaron menores valores de ácido oleico (18:1n-9) que los adultos ($P<0,01$), similares a los de los longevos.

Dentro de los ácidos grasos **saturados**, el esteárico (18:0) se vio aumentado en el bazo de longevos en relación a los niveles mostrados por los adultos ($P<0,01$). El bazo de viejos presentó valores de ácido behénico (22:0) disminuidos en relación a los longevos ($P<0,01$), cuyos niveles fueron similares a los de los adultos (Tabla 22A).

En el bazo de longevos, aumentó la **fracción** total de ácidos grasos saturados (SFA) mientras que disminuyó la de insaturados (UFA), en relación a los adultos ($P<0,05$). En viejos, la fracción total de ácidos grasos poli-insaturados de la familia n-6 (PUFAn-6) aumentó con respecto a la edad adulta, mientras que la de los PUFAn-3 se vio disminuida

($P<0,05$). La fracción total de ácidos grasos mono-insaturados (MUFA) disminuyó en el bazo de viejos y longevos en relación al porcentaje que estos ácidos grasos representan en el bazo de los adultos ($P<0,01$) (Tabla 22B).

Los índices **ACL**, **DBI** y **PI** no sufrieron variaciones a lo largo de la edad en bazo (Tabla 22C).

Tabla 21. Análisis de la composición en ácidos grasos en cerebro de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. A) Composición en ácidos grasos (% mol) de lípidos totales procedentes de cerebro, B) Fracciones lipídicas (% mol), y C) Índices relacionados.

	Adultos	Viejos	Longevos
A) Composición en ácidos grasos (% mol)			
14:0	0,36±0,07	0,32±0,05	0,41±0,05
16:0	19,33±0,57	19,53±0,45	20,68±0,27
16:1n-7	0,66±0,03	0,62±0,04	0,84±0,07*
18:0	19,62±0,57	19,08±0,18	20,61±1,14
18:1n-9	20,46±0,43	24,43±0,42***	24,13±0,50***
18:2n-6	1,14±0,06	0,70±0,02***	0,89±0,09*
18:4n-3	4,54±0,27	2,53±0,44*	3,47±0,58
20:0	0,87±0,09	0,71±0,03	0,80±0,04
20:1n-9	4,10±0,24	4,21±0,24	3,64±0,14
20:2n-6	0,90±0,14	0,60±0,11*	1,05±0,11
20:3n-6	0,43±0,04	0,38±0,01	0,48±0,05
20:4n-6	6,76±0,11	7,75±0,33	7,01±0,35
20:5n-3	4,84±0,53	2,11±0,35***	2,42±0,35***
22:5n-6	1,83±0,08	1,54±0,15	1,31±0,09*
22:5n-3	0,52±0,04	0,40±0,02*	0,48±0,03
22:6n-3	13,56±0,09	15,02±0,61***	11,70±0,63
B) Fracciones lipídicas (% mol)			
SFA	40,20±0,70	39,65±0,53	42,51±1,39
UFA	59,79±0,70	60,34±0,53	57,48±1,39
MUFA	25,23±0,42	29,27±0,64***	28,63±0,63**
PUFA	34,56±0,53	31,06±0,33	28,85±1,91*
PUFAn-6	11,08±0,31	10,99±0,29	10,76±0,55
PUFAn-3	23,47±0,56	20,07±0,40*	18,09±1,38**
C) Índices relacionados			
ACL	18,58±0,02	18,57±0,03	18,40±0,04**
DBI	193,27±2,64	184,62±2,03*	167,29±8,16**
PI	200,51±3,32	188,48±2,98*	164,58±9,94**

Se muestra la media ± el error estándar de 6-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6 adultos; 11 viejos; 8 longevos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta. *** $P<0,001$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad longeva. SFA = ácidos grasos saturados; UFA = ácidos grasos insaturados; MUFA = ácidos grasos mono-insaturados; PUFA = ácidos grasos poli-insaturados; PUFAn-6 = ácidos grasos poli-insaturados de la familia n-6; PUFAn-3 = ácidos grasos poli-insaturados de la familia n-3; ACL = longitud de cadena de los ácidos grasos; DBI = índice de dobles enlaces; PI = índice de peroxidizabilidad lipídica.

Tabla 22. Análisis de la composición en ácidos grasos en bazo de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. A) Composición en ácidos grasos (% mol) de lípidos totales procedentes de bazo, B) Fracciones lipídicas (% mol), y C) Índices relacionados.

	Adultos	Viejos	Longevos
A) Composición en ácidos grasos (% mol)			
14:0	0,86±0,08	0,68±0,08	0,60±0,10
16:0	21,62±1,17	23,23±0,37	21,98±0,41
16:1n-7	2,21±0,37	1,80±0,10	1,56±0,14*
18:0	12,14±0,67	14,58±0,41	16,12±0,97**
18:1n-9	19,74±0,97	14,92±0,43**	14,49±1,37**
18:2n-6	6,23±0,17	5,36±0,21*	5,64±0,22
18:4n-3	7,80±0,10	3,52±0,40***	6,12±0,52*
20:0	0,50±0,11	0,65±0,11	0,64±0,07
20:1n-9	0,76±0,09	0,77±0,04	0,82±0,091
20:2n-6	1,30±0,38	0,99±0,21	0,77±0,13
20:3n-6	0,83±0,17	0,65±0,09	0,87±0,08
20:4n-6	13,11±0,62	19,71±0,70*	15,23±1,93
22:0	6,52±0,03	3,85±0,75**	7,72±1,19
22:4n-6	0,78±0,03	1,27±0,13	1,06±0,14
22:6n-3	4,64±0,46	6,86±0,37*	5,13±0,56
24:0	0,88±0,22	1,08±0,13	1,17±0,10
B) Fracciones lipídicas (% mol)			
SFA	42,54±0,38	44,09±0,67	48,26±1,79*
UFA	57,45±0,38	55,90±0,67	51,73±1,79*
MUFA	22,72±1,29	17,50±0,47**	16,88±1,44**
PUFA	34,73±1,50	38,39±0,62	34,84±2,66
PUFAn-6	22,27±1,11	28,00±0,60*	23,59±2,07
PUFAn-3	12,45±0,39	10,39±0,30*	11,25±0,79
C) Índices relacionados			
ACL	18,35±0,08	18,47±0,03	18,49±0,06
DBI	155,01±4,79	171,45±3,25	152,82±10,56
PI	133,76±6,42	161,10±4,19	139,34±12,70

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6 adultos; 10 viejos; 9 longevos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta. ** $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de edad longeva. SFA = ácidos grasos saturados; UFA = ácidos grasos insaturados; MUFA = ácidos grasos monoinsaturados; PUFA = ácidos grasos poliinsaturados; PUFAn-6 = ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6; PUFAn-3 = ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3; ACL = longitud de cadena de los ácidos grasos; DBI = índice de dobles enlaces; PI = índice de peroxidizabilidad lipídica.

4.1.1.3.3. Actividad del proteasoma 20S.

En general, los resultados mostraron que las actividades enzimáticas del proteasoma 20S se encuentran más conservadas en longevos que en viejos, con respecto a los adultos.

En **corazón** (Fig. 41,42), se observó un efecto general de la edad sobre ambas actividades proteasómicas estudiadas, quimiotripsina ($P<0,05$) y caspasa ($P<0,001$). Si bien no existieron diferencias significativas, la actividad quimiotripsina (Fig. 41A) en el corazón

de los longevos ($21,59 \pm 1,57$ actividad/mg proteína) tendió hacia valores mayores que en los adultos ($15,54 \pm 1,94$ actividad/mg proteína), mientras que la de los viejos ($11,50 \pm 4,16$ actividad/mg proteína) tendió hacia valores menores en relación a éstos, siendo significativamente menores en comparación con los longevos ($P < 0,05$). Por otra parte, la actividad caspasa (Fig. 41B) de este órgano en longevos ($56,38 \pm 3,22$ actividad/mg proteína) fue menor ($P < 0,01$) en relación a los adultos ($70,71 \pm 2,78$ actividad/mg proteína), y aún más baja ($P < 0,001$) en los viejos ($53,60 \pm 2,55$ actividad/mg proteína).

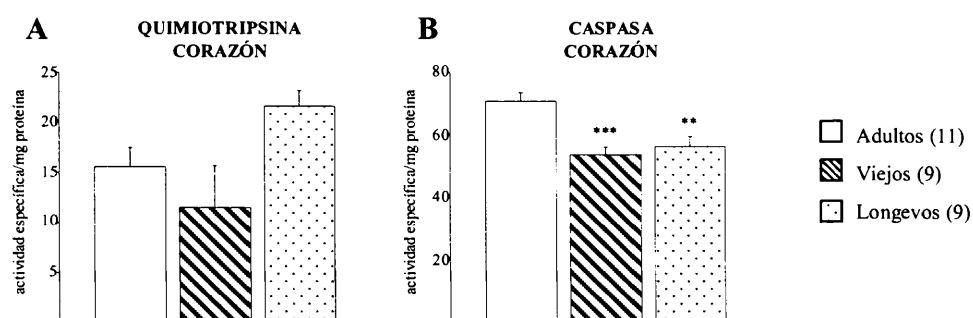


Figura 41. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en corazón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 9-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

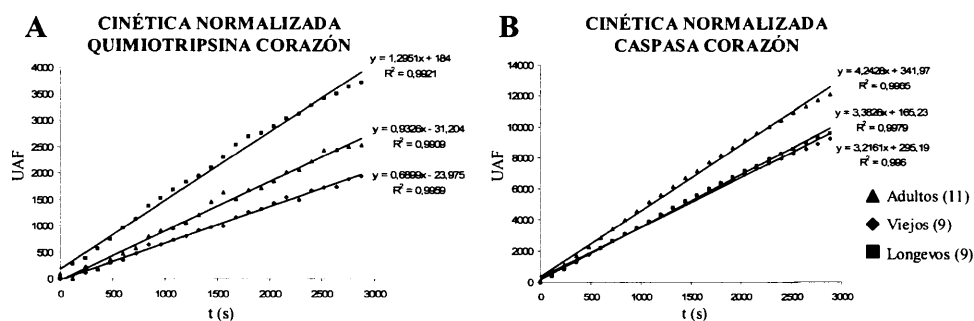


Figura 42. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 60 μ g de corazón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 9-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

La edad produjo también un efecto general sobre las actividades quimi tripsina y caspasa de **pulmón** ($P < 0,01$) (Fig. 43,44). Los viejos ($719,04 \pm 98,59$ y $236,84 \pm 23,29$ actividad/mg proteína, respectivamente) mostraron ambas actividades proteasómicas disminuidas ($P < 0,01$) con respecto a los adultos ($1086,47 \pm 72,89$ y $337,96 \pm 17,45$

actividad/mg proteína, respectivamente), mientras que los longevos tuvieron valores similares a éstos ($826,51 \pm 66,13$ y $275,08 \pm 21,30$ actividad/mg proteína, respectivamente) (Fig. 43A,B).

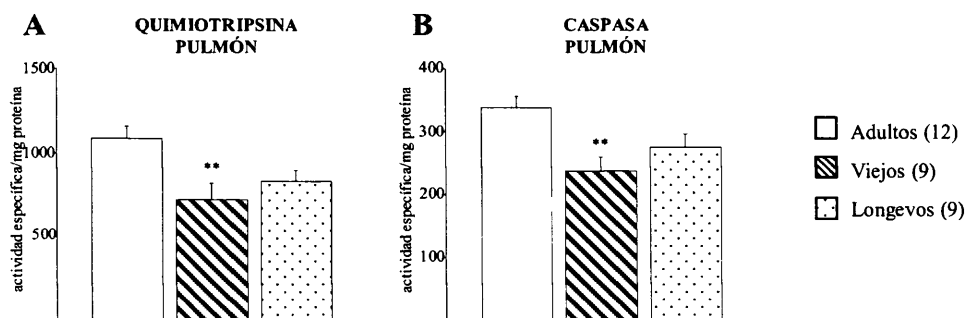


Figura 43. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en pulmón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 9-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

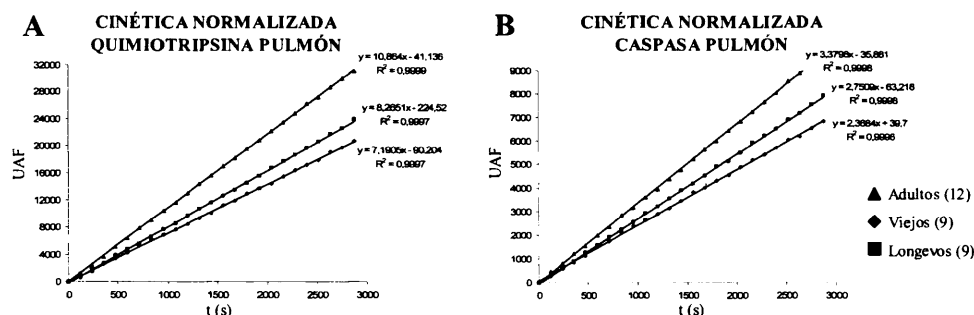


Figura 44. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 10 μ g de pulmón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 9-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

En **hígado** (Fig. 45,46), se observó un efecto general de la edad sobre la actividad quimi tripsina ($P < 0,001$) y también sobre la actividad tipo caspasa ($P < 0,05$). La actividad quimi tripsina (Fig. 45A) fue mayor ($P < 0,05$) en viejos ($134,13 \pm 12,08$ actividad/mg proteína) y aún más ($P < 0,001$) en longevos ($162,26 \pm 15,14$ actividad/mg proteína), con respecto a los adultos ($88,53 \pm 7,52$ actividad/mg proteína). En el caso de la actividad caspasa (Fig. 45B), se dio una mayor ($P < 0,05$) actividad en el hígado de viejos ($263,74 \pm 25,59$ actividad/mg proteína) en relación a los adultos ($184,77 \pm 15,86$

actividad/mg proteína), mientras que los longevos ($242,38 \pm 15,52$ actividad/mg proteína) mostraron valores más similares a éstos.

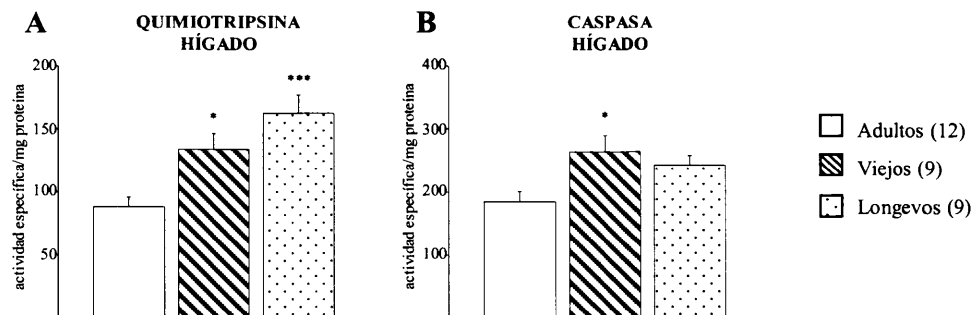


Figura 45. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en hígado de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 9-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P<0,001$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

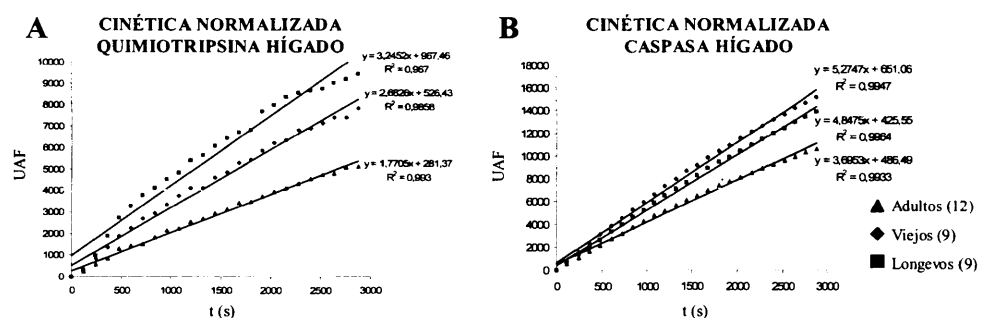


Figura 46. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 20 µg de hígado de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 9-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

Con respecto al **riñón**, la edad produjo un efecto general sobre las actividades quimi tripsina ($P<0,001$) y caspasa ($P<0,05$) (Fig. 47,48). La actividad quimi tripsina fue menor ($P<0,01$) en viejos ($466,85 \pm 83,10$ actividad/mg proteína) y en longevos ($509,60 \pm 102,65$ actividad/mg proteína) con respecto a adultos ($938,35 \pm 84,00$ actividad/mg proteína) (Fig. 47A). Por otra parte, la actividad tipo caspasa fue mayor ($P<0,05$) en viejos ($418,85 \pm 32,15$ actividad/mg proteína) que en adultos ($301,85 \pm 31,85$ actividad/mg proteína), mostrando los longevos ($308,95 \pm 21,75$ actividad/mg proteína) valores similares a éstos (Fig. 47B).

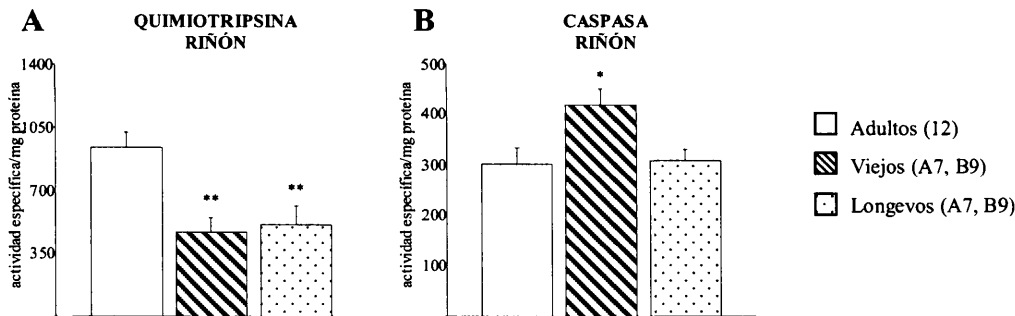


Figura 47. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en riñón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

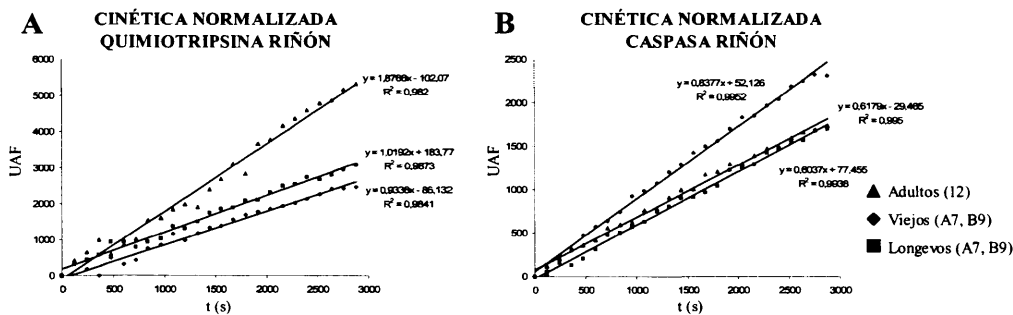


Figura 48. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 2 μ g de riñón de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 7-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

No existió efecto general de la edad sobre la actividad proteasómica en **ganglios axilares** (Fig. 49,50). No obstante, se observó una tendencia hacia menores valores en viejos tanto de la actividad tipo quimi tripsina ($240,17 \pm 23,99$ actividad/mg proteína) (Fig. 49A) como de la tipo caspasa ($108,17 \pm 7,53$ actividad/mg proteína) (Fig. 49B) con respecto a los adultos ($409,61 \pm 57,37$ y $129,44 \pm 4,29$ actividad/mg proteína, respectivamente), mientras que los longevos ($335,85 \pm 70,36$ y $141,33 \pm 19,04$ actividad/mg proteína, respectivamente) mostraron valores más próximos a ellos.

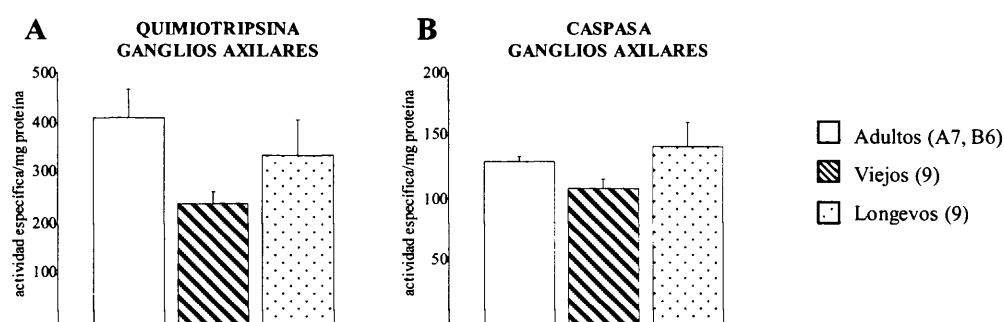


Figura 49. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en ganglios axilares de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

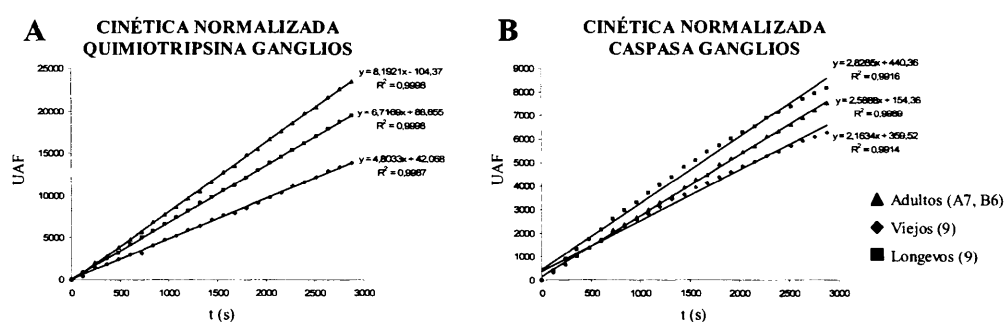


Figura 50. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 20 µg de ganglios axilares de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 6-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

Por último, la edad tuvo un efecto general sobre la actividad quimi tripsina ($P < 0,05$) y también sobre la tipo caspasa ($P < 0,001$) en los **leucocitos peritoneales** murinos (Fig. 51,52). La actividad quimi tripsina (Fig. 51A) fue mayor ($P < 0,01$) en viejos ($471,34 \pm 66,34$ actividad/mg proteína) que en adultos ($186,82 \pm 28,22$ actividad/mg proteína), mientras que no existieron diferencias significativas entre longevos ($473,36 \pm 151,38$ actividad/mg proteína) y adultos. En el caso de la caspasa (Fig. 51B), ambos viejos ($141,87 \pm 28,78$ actividad/mg proteína) y longevos ($198,33 \pm 29,42$ actividad/mg proteína) mostraron mayor ($P < 0,05$) actividad que los adultos ($48,79 \pm 6,58$ actividad/mg proteína).

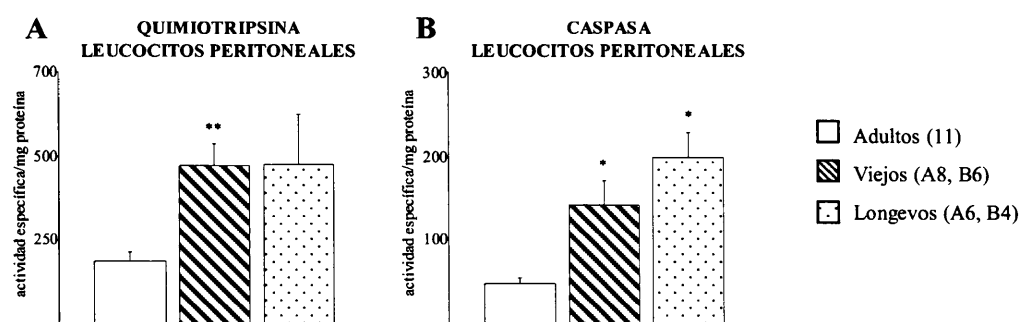


Figura 51. Actividades quimi tripsina (actividad específica/mg proteína) (A) y caspasa (actividad específica/mg proteína) (B) en leucocitos peritoneales de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta.

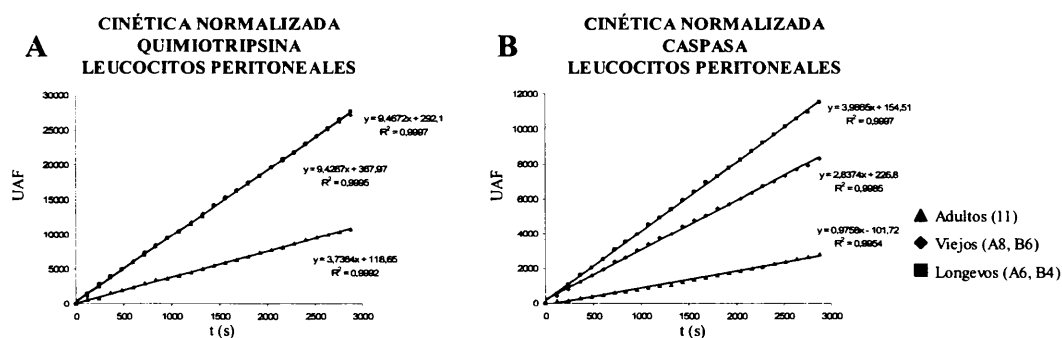


Figura 52. Cinética normalizada de las actividades quimi tripsina (A) y caspasa (B) en 20 μ g de leucocitos peritoneales de ratones hembras BALB/c adultos, viejos y longevos. Se representa las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) obtenidas frente al tiempo en segundos, siendo cada punto la media de 4-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y cada valor la media de ensayos realizados por triplicado.

4.1.2. Envejecimiento prematuro: mujeres con ansiedad, estrés en personas sin hogar, y aislamiento social en ratones viejos hembras.

4.1.2.1. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y en los niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol en mujeres con ansiedad.

4.1.2.1.1. Neutrófilos: *Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.*

No se observaron diferencias en la capacidad de **adherencia** de neutrófilos entre mujeres ansiosas y no ansiosas (I.A.= 50 ± 4 y 50 ± 2 , respectivamente). Con respecto a la **función quimiotáctica** (Fig. 53A), los neutrófilos de las mujeres con ansiedad mostraron un índice (I.Q.= 307 ± 24) significativamente menor ($P < 0,001$) que el de las células

procedentes de las mujeres del grupo control. El índice de **fagocitosis** (Fig. 53B) se encontraba disminuido en las mujeres ansiosas (I.F.= 174 ± 27 ; $P<0,01$) en comparación con el mostrado por las mujeres no ansiosas (I.F.= 348 ± 45). Asimismo, el porcentaje de células fagocíticas (Fig. 53C) fue menor ($P<0,001$) en las mujeres ansiosas (E.F.= 22 ± 3) que en las controles (E.F.= 63 ± 4). Por otra parte, los niveles de **anión superóxido** tanto en muestras no estimuladas como en las estimuladas (Fig. 53D) aparecieron aumentados en las mujeres ansiosas (84 ± 6 y 117 ± 8 nmol/ 10^6 células, respectivamente; $P<0,001$) al compararlos con aquéllos del grupo control (44 ± 2 y 70 ± 3 nmol/ 10^6 células, respectivamente).

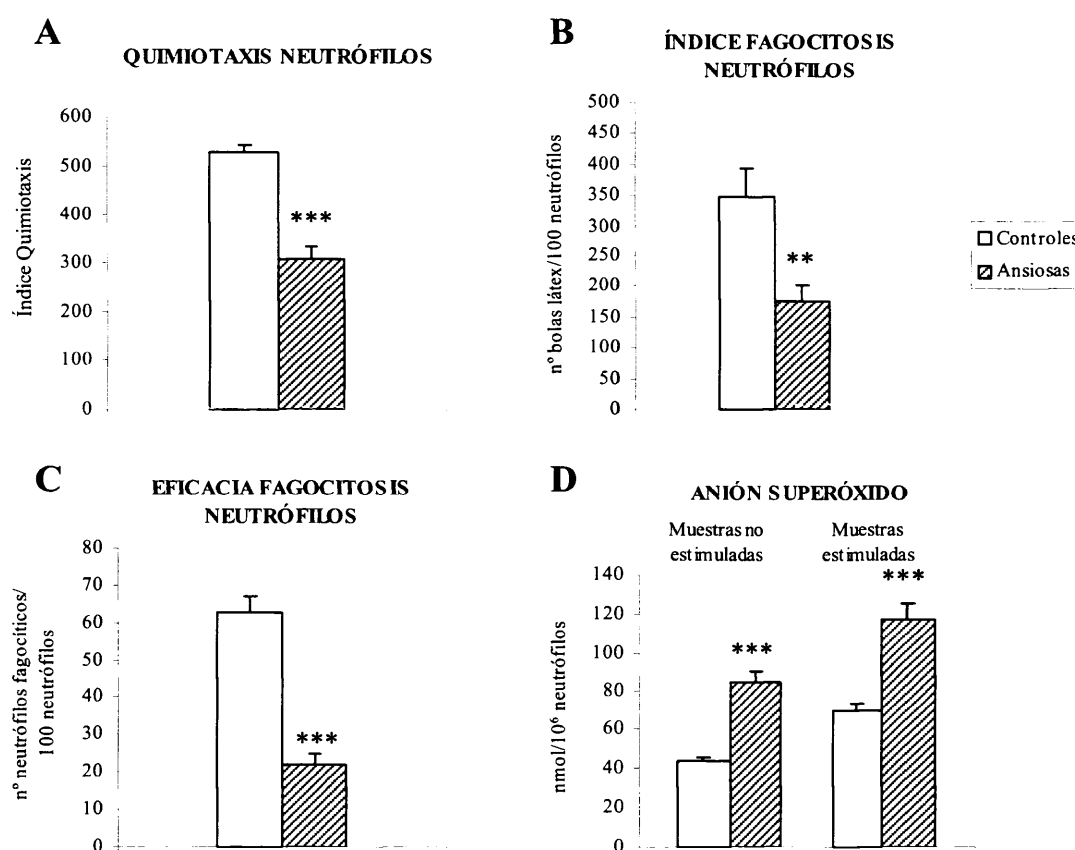


Figura 53. Índice de quimiotaxis (número de neutrófilos) (A), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (B), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos fagocíticos/100 neutrófilos) (C) y niveles de anión superóxido en muestras no estimuladas y estimuladas (nmol/ 10^6 neutrófilos) (D) de neutrófilos humanos procedentes de sangre periférica de mujeres ansiosas y no ansiosas (controles) de la misma edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 33 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$ con respecto al valor del grupo control.

4.1.2.1.2. Linfocitos: *Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK*

No se encontraron diferencias en la **adherencia** de linfocitos entre mujeres ansiosas y no ansiosas (I.A.= 54 ± 3 y 50 ± 3 , respectivamente). Con respecto a la **función quimiotáctica** (Fig. 54A), las mujeres ansiosas mostraron un índice (I.Q.= 182 ± 16) significativamente menor ($P<0,001$) que las no ansiosas (I.Q.= 339 ± 19). Los resultados de **linfoproliferación** en respuesta a PHA se muestran en la figura 54B. Esta función se encontraba también disminuida (25808 ± 4358 cpm; $P<0,001$) en las mujeres con ansiedad en relación a las pertenecientes al grupo control (41799 ± 1399 cpm). Por último, en lo que respecta a la **actividad NK** (Fig. 54C), las mujeres con ansiedad mostraron un declive muy marcado de esta función (% lisis= 35 ± 4 ; $P<0,001$) en comparación con los valores obtenidos en las mujeres del grupo control (% lisis= 55 ± 2).

4.1.2.1.3. Citoquinas: *Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α*

Los niveles de **IL-2** en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con PHA (Fig. 55A) fueron menores ($P<0,001$) en mujeres ansiosas (118 ± 29 pg/ml) con respecto a las control (251 ± 19 pg/ml), mientras que los de **TNF- α** , valorados en los sobrenadantes de cultivos de sangre total estimulados con LPS (Fig. 55B), se encontraban aumentados ($P<0,05$) en los sujetos ansiosos (1248 ± 54 pg/ml) en comparación con el grupo control (1094 ± 49 pg/ml).

4.1.2.1.4. Niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.

Los niveles plasmáticos de **capacidad antioxidante total** (Fig. 56A) se encontraban disminuidos ($P<0,05$) en mujeres ansiosas (223 ± 11 U/ml) en comparación con las controles (260 ± 14 U/ml). Con respecto al **cortisol** plasmático (Fig. 56B), las mujeres ansiosas mostraron mayores niveles (37 ± 6 ng/ml; $P<0,001$) comparados con los de las no ansiosas (12 ± 1 ng/ml).

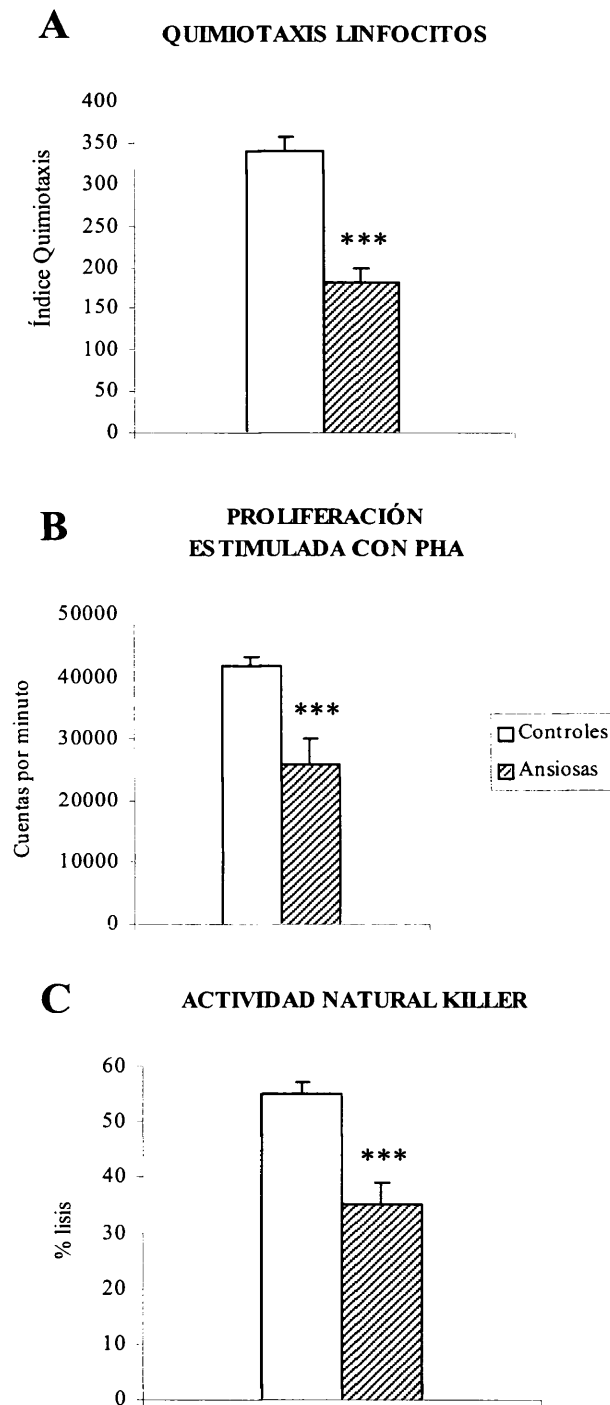


Figura 54. Índice de quimiotaxis (número de linfocitos) (A), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) (B) y actividad *Natural Killer* (% lisis) (C) de linfocitos humanos procedentes de sangre periférica de mujeres ansiosas y no ansiosas (controles) de la misma edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 33 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo control.

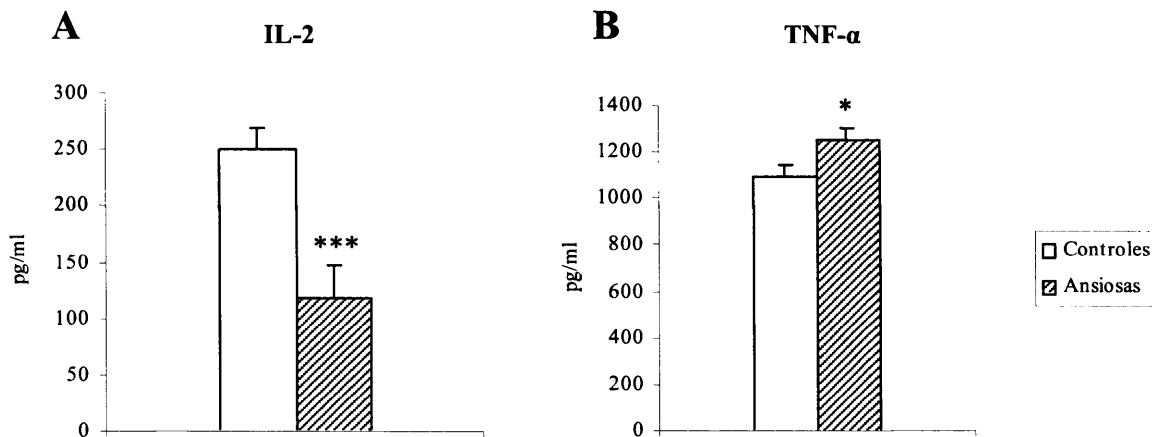


Figura 55. Niveles de IL-2 (pg/ml) (A) en sobrenadantes de cultivo de linfocitos procedentes de sangre periférica humana estimulados con PHA, y de TNF- α (pg/ml) (B) en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS de mujeres ansiosas y no ansiosas (controles) de la misma edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 33 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control.

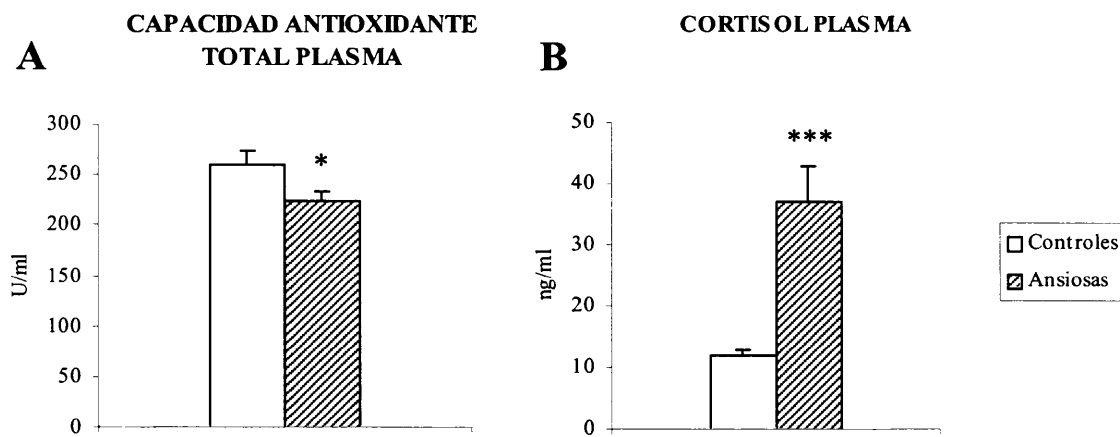


Figura 56. Niveles plasmáticos de capacidad antioxidante total (U/ml) (A) y de cortisol (ng/ml) (B) en mujeres ansiosas y no ansiosas (controles) de la misma edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 33 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control.

4.1.2.2. Efecto del estrés en personas sin hogar sobre la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y sobre los niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.

4.1.2.2.1. Neutrófilos: *Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.*

En relación a la **capacidad de adherencia** de los neutrófilos (Fig. 57A), las personas sin hogar mostraron un índice significativamente menor que el de los controles de la población general de su mismo sexo y edad (I.A.= 30 ± 3 y 49 ± 2 , respectivamente, $P<0,001$). La **función quimiotáctica** de estas células (Fig. 57B) en personas sin techo (I.Q.= 370 ± 39) también se encontraba disminuida ($P<0,001$) en comparación con los controles (I.Q.= 578 ± 25). Por otra parte, la **capacidad fagocítica** de los neutrófilos, medida tanto en número de partículas fagocitadas por 100 células (I.F., Fig. 57C) como en porcentaje de células que fagocitan (E.F., Fig. 57D), se encontraba muy disminuida ($P<0,001$) en las personas sin hogar (I.F.= 68 ± 9 , E.F.= 16 ± 2) con respecto a los controles (I.F.= 258 ± 28 , E.F.= 61 ± 3). Del mismo modo, los niveles de **anión superóxido** en muestras no estimuladas y estimuladas (Fig. 57E) fueron menores en las personas sin techo (33 ± 4 y 40 ± 5 nmol/ 10^6 células, respectivamente; $P<0,001$) al compararlos con los del grupo control (70 ± 4 y 93 ± 5 nmol/ 10^6 células, respectivamente).

4.1.2.2.2. Linfocitos: *Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.*

Se observó una disminución ($P<0,01$) en la **adherencia** de los linfocitos de las personas sin hogar (I.A.= 41 ± 3), al compararla con esta misma función en los linfocitos procedentes de controles de la población general (I.A.= 52 ± 2 , Fig. 58A). En relación a la **función quimiotáctica** (Fig. 58B), las personas sin techo mostraron un índice (I.Q.= 224 ± 20) significativamente menor ($P<0,001$) que los controles (I.Q.= 359 ± 18). De la misma forma, la **linfoproliferación** en respuesta a PHA (Fig. 58C) se encontraba disminuida (25375 ± 3172 cpm; $P<0,001$) en sujetos sin techo con respecto a los controles (41855 ± 1601 cpm). Por último, en relación a la **actividad NK** (Fig. 58D), las personas sin hogar mostraron también unos valores de esta función (% lisis= 28 ± 4) significativamente menores ($P<0,001$) que los del grupo control (% lisis= 55 ± 2).

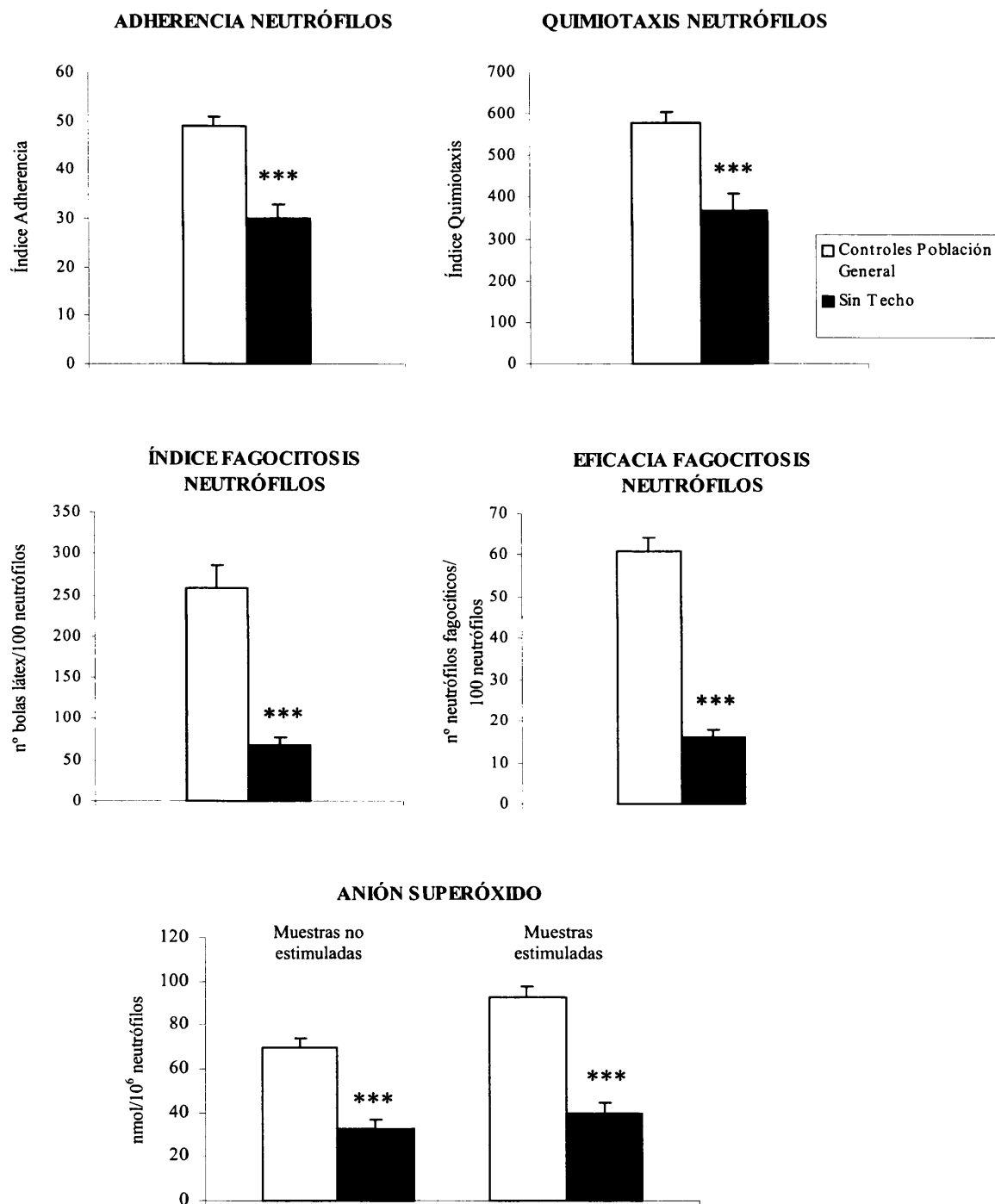


Figura 57. Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos) (B), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (C), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos fagocíticos/100 neutrófilos) (D) y niveles de anión superóxido en muestras no estimuladas y estimuladas (nmol/10⁶ neutrófilos) (E) de neutrófilos humanos procedentes de sangre periférica de personas sin hogar y controles de igual sexo y edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 40 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo control.

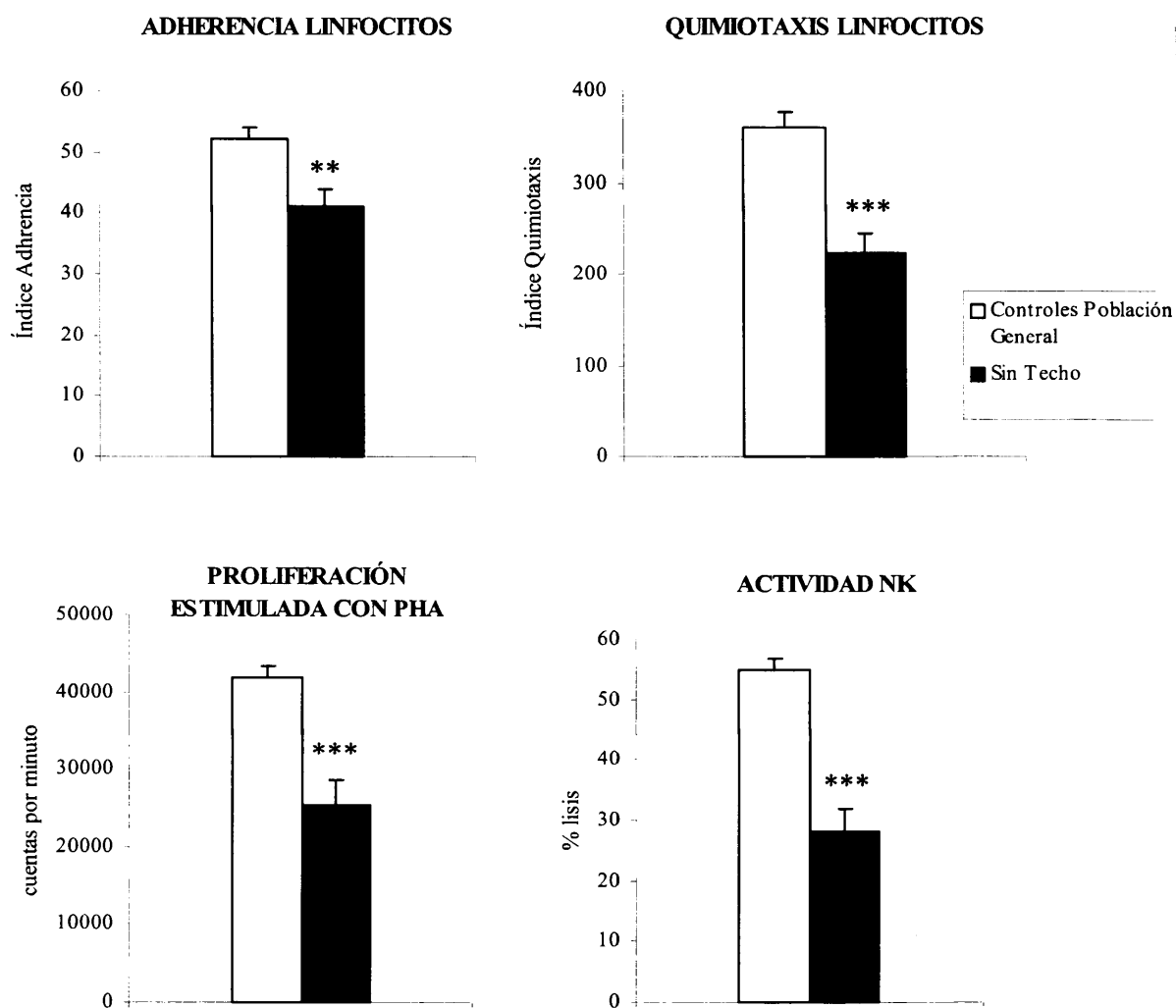


Figura 58. Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos) (B), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) (C) y actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) (D) de linfocitos humanos procedentes de sangre periférica de personas sin hogar y controles de la población general de igual sexo y edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 40 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo control.

4.1.2.2.3. Citoquinas: *Interleuquina 2* y *factor de necrosis tumoral α* .

Los niveles de **IL-2** en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con PHA (Fig. 59A) fueron menores ($P<0,001$) en personas sin hogar (104 ± 28 pg/ml) con respecto a los niveles encontrados en los controles de la población general (285 ± 14 pg/ml). Por otra parte, no se encontraron diferencias en los niveles de **TNF- α** valorados en los sobrenadantes de cultivos de sangre total estimulados con LPS (Fig. 59B) entre los sujetos sin techo (1047 ± 71 pg/ml) y los controles (943 ± 52 pg/ml).

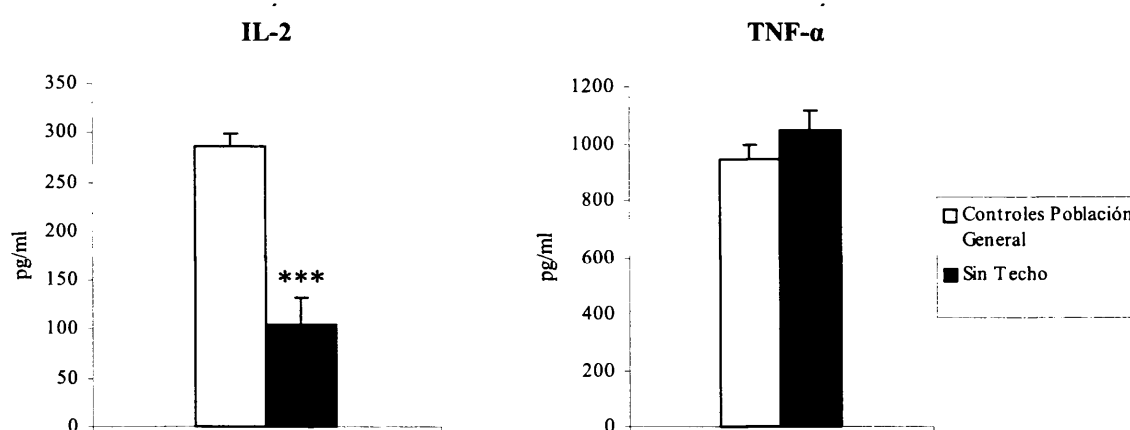


Figura 59. Niveles de IL-2 (pg/ml) (A) en sobrenadantes de cultivo de linfocitos procedentes de sangre periférica humana estimulados con PHA, y de TNF- α (pg/ml) (B) en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS de personas sin hogar y controles de la población general de igual sexo y edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo control.

4.1.2.2.4. Niveles plasmáticos de antioxidantes totales y cortisol.

Los niveles plasmáticos de **antioxidantes totales** (Fig. 60A) fueron menores ($P<0,05$) en personas sin techo (234 ± 13 U/ml) en comparación con los controles (270 ± 13 U/ml). Finalmente, no se encontraron diferencias con respecto al **cortisol** plasmático (Fig. 60B) entre las personas sin hogar (22 ± 3 ng/ml) y los controles de la población general (16 ± 2 ng/ml), aunque se aprecia un valor numéricamente superior de los niveles en los primeros.

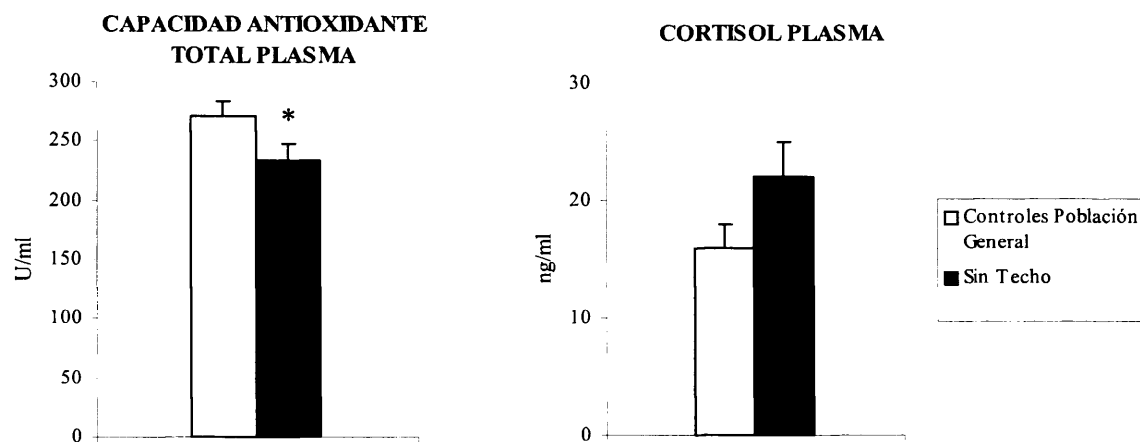


Figura 60. Niveles plasmáticos de capacidad antioxidante total (U/ml) (A) y de cortisol (ng/ml) (B) en personas sin hogar y controles de la población general de igual sexo y edad. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 28 (A) y 17 (B) valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control.

4.1.2.3. Efecto del aislamiento social durante la vejez sobre el deterioro asociado a la edad en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones muy viejos C57BL/129Sv hembras.

4.1.2.3.1. Función linfocitaria: *Quimiotaxis, proliferación y actividad NK*

Los resultados relativos a la función de linfocitos de bazo y timo se muestran en las figuras 61,62.

En **linfocitos de bazo**, las funciones que se vieron más afectadas por el aislamiento de los individuos durante su vejez fueron la quimiotaxis, que aumentó ($P < 0,001$) en los muy viejos aislados con respecto a los mantenidos en grupo, y la proliferación en respuesta al mitógeno concanavalina A, que se vio disminuida ($P < 0,05$). La proliferación en reposo (1562 ± 388 cpm en controles; 1260 ± 207 cpm en aisladas) así como en respuesta a lipopolisacárido, ni la actividad NK de las células esplénicas sufrieron cambios como consecuencia del aislamiento en la vejez (Fig. 61).

LINFOCITOS ESPLÉNICOS

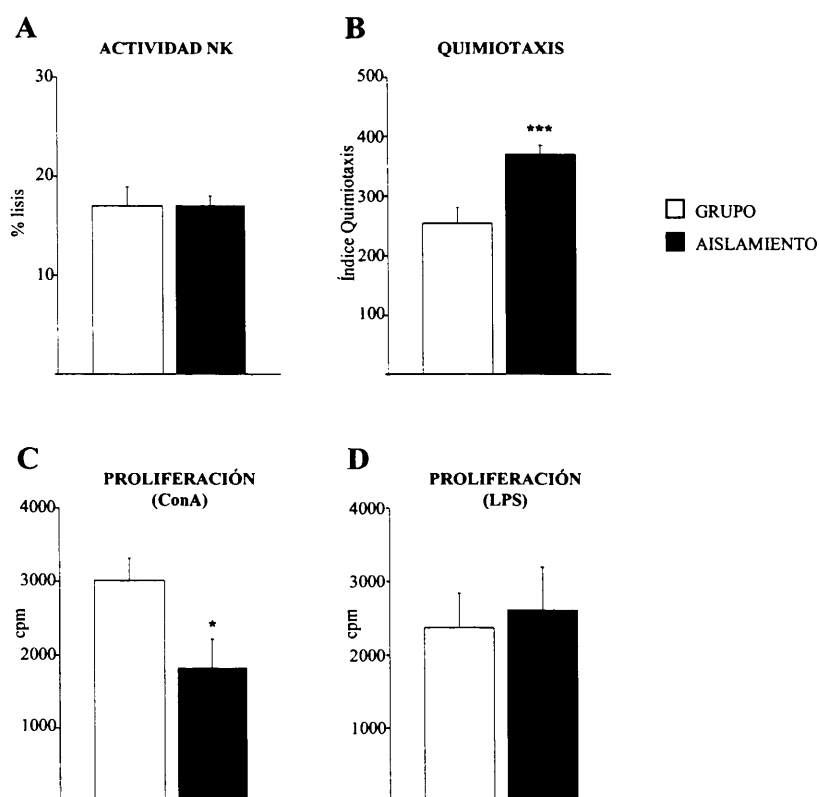


Figura 61. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) (A), índice de quimiotaxis (número de células) (B), y proliferación (cuentas por minuto) estimulada con concanavalina A (ConA) (C) y lipopolisacárido (LPS) (D) de linfocitos esplénicos procedentes de ratones muy viejos mantenidos en grupo (grupo) y aislados socialmente de los 18 a los 24 meses de edad (aislamiento). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (5-7 muy viejos en grupo; 5-10 aislados). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control no aislado.

En **linfocitos tímicos**, se observó una disminución de la actividad NK ($P < 0,001$) así como de la proliferación estimulada por concanavalina A ($P < 0,05$) en los animales aislados socialmente durante su vejez, con respecto a los controles de la misma edad mantenidos en grupo. La proliferación en reposo (1003 ± 149 cpm en controles; 1185 ± 111 cpm en aisladas) así como en respuesta a lipopolisacárido, y la quimiotaxis de los linfocitos de timo se mantuvieron en niveles similares en ambos grupos experimentales (Fig. 62).

LINFOCITOS TÍMICOS

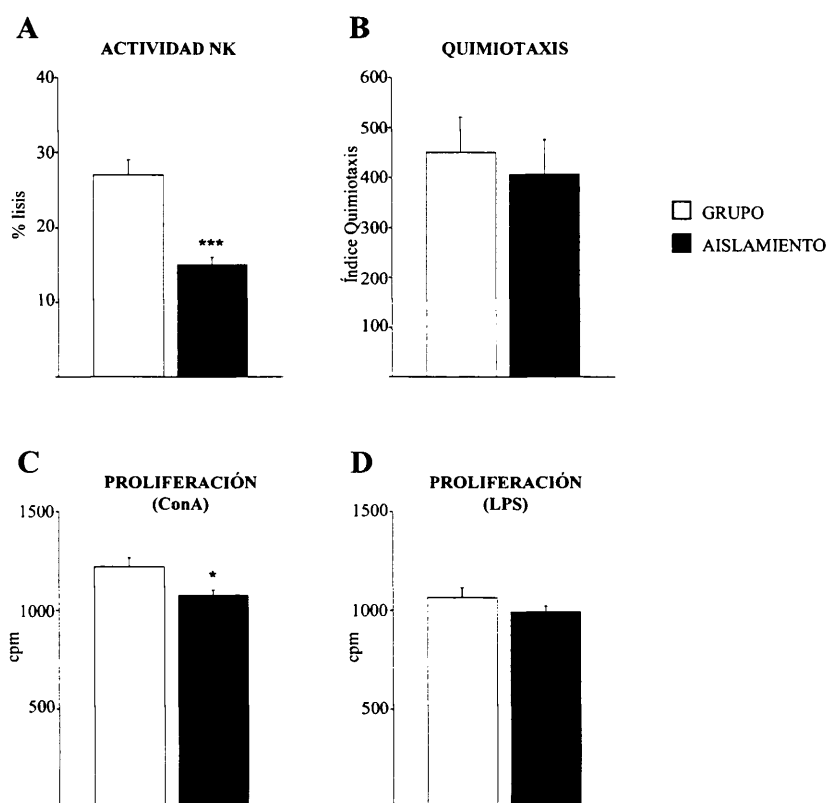


Figura 62. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) (A), índice de quimiotaxis (número de células) (B), y proliferación (cuentas por minuto) estimulada con concanavalina A (ConA) (C) y lipopolisacárido (LPS) (D) de linfocitos tímicos procedentes de ratones muy viejos hembras mantenidos en grupo (grupo) y aislados socialmente de los 18 a los 24 meses de edad (aislamiento). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (5-7 muy viejos en grupo; 5-10 aislados). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control no aislado.

4.1.2.3.2. Citoquinas: *Interleuquina 2* y *factor de necrosis tumoral α* .

Los niveles de **IL-2** en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos en presencia de concanavalina A fueron similares para ambos grupos experimentales, tanto en bazo ($27,73 \pm 2,27$ pg/ml en 7 controles; $27,48 \pm 3,69$ pg/ml en 7 aislados) como en timo ($16,38 \pm 2,21$ pg/ml en 6 controles; $14,55 \pm 1,97$ pg/ml en 9 aislados).

Con respecto a los niveles de **TNF- α** en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos en respuesta a lipopolisacárido, aumentaron ($P < 0,05$) en el bazo de los ratones muy viejos hembras aislados en la vejez en relación a los valores encontrados en las hembras de la misma edad mantenidas en grupo (Fig. 63).

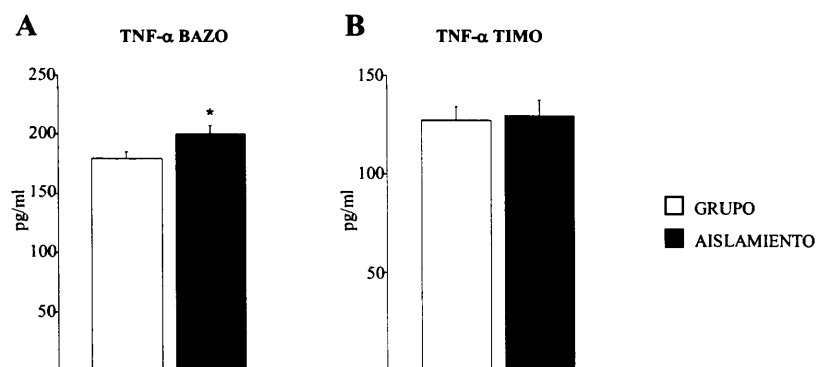


Figura 63. Niveles de TNF- α en sobrenadantes de cultivos de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B) estimulados con lipopolisacárido, procedentes de ratones muy viejas hembras mantenidos en grupo (grupo) y aislados socialmente de los 18 a los 24 meses de edad (aislamiento). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-8 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6-7 muy viejas en grupo; 7-8 aislados). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo control no aislado.

4.1.2.3.3. Defensa antioxidante: *Niveles intralinfocitarios de glutatión total.*

Los niveles de glutatión (GSH) intracelular disminuyeron en los linfocitos de bazo procedentes de los ratones muy viejas hembras aislados con respecto a los mantenidos en grupo ($P < 0,01$); hecho que no se reprodujo en los linfocitos tímicos, donde el contenido intracelular de GSH fue similar para ambos grupos (Fig. 64).

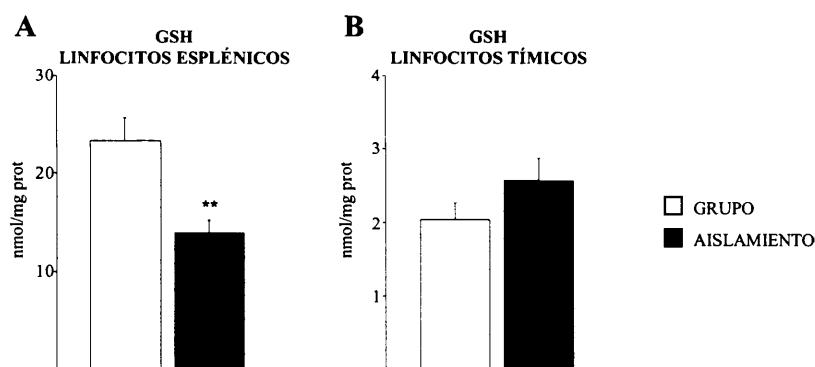


Figura 64. Valores de glutatión (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B) procedentes de ratones muy viejas hembras mantenidos en grupo (grupo) y aislados socialmente de los 18 a los 24 meses de edad (aislamiento). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (6 muy viejas en grupo; 7-9 aislados). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo control no aislado.

4.1.2.3.4. Niveles plasmáticos de corticosterona.

Los valores de corticosterona plasmática fueron significativamente mayores ($P<0,05$) en los muy viejos aislados en relación a los controles de la misma edad mantenidos en grupo (Fig. 65).

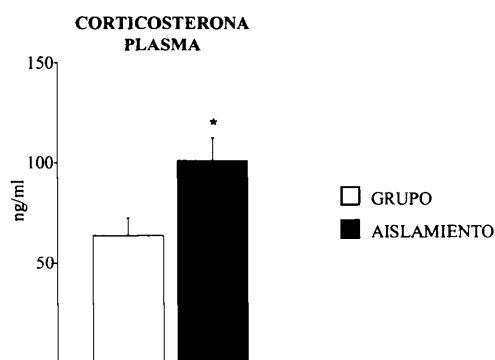


Figura 65. Niveles corticosterona (ng/ml) en plasma procedente de ratones muy viejos hembras mantenidos en grupo (grupo) y aislados socialmente de los 18 a los 24 meses de edad (aislamiento). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7 muy viejos en grupo; 10 aisladas). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo control no aislado.

4.1.3. Envejecimiento patológico: Modelo murino para la enfermedad de Alzheimer.

Cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad

4.1.3.1. Función linfocitaria: *Quimiotaxis, proliferación y actividad NK*

Los resultados relativos a la función de linfocitos de bazo y timo se muestran en la tabla 23 y en las figuras 66-68.

En controles no transgénicos, se observó un efecto general de la edad aumentando la **quimiotaxis de los linfocitos esplénicos y tímicos** ($P<0,001$). Las diferencias en función del sexo en esta función sólo fueron significativas en el caso de los linfocitos de timo ($P<0,05$), cuya quimiotaxis fue mayor en hembras que en machos. No obstante, la edad tuvo un efecto diferencial en función del sexo en ambos órganos ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente). Así, el análisis estadístico más exhaustivo reveló valores similares en

Tabla 23. Índice de quimiotaxis (número de linfocitos), proliferación (cuentas por minuto) no estimulada (basal) y estimulada con concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS), y actividad *Natural Killer* (% lisis) de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Función linfocitos		Adultos NTg	Viejos	
			NTg	3xTgAD
Índice quimiotaxis (n° linfocitos)				
Bazo	Hembras	1230±372	5510±340	8468±338
	Machos	1441±387	4227±377	4371±448
Timo	Hembras	1030±282	5766±298	8544±411
	Machos	1119±291	4295±246	5141±344
Proliferación basal (cuentas por minuto)				
Bazo	Hembras	1687±460	1088±198	1321±255
	Machos	935±32	873±170	1462±471
Timo	Hembras	896±86	427±35	536±59
	Machos	903±73	306±31	421±26
Proliferación en respuesta a ConA (cuentas por minuto)				
Bazo	Hembras	1975±502	2176±398	2577±327
	Machos	1781±404	2287±183	2187±234
Timo	Hembras	1034±102	423±41	377±33
	Machos	848±58	273±19	427±36
Proliferación en respuesta a LPS (cuentas por minuto)				
Bazo	Hembras	3396±814	13809±1373	13373±554
	Machos	2609±544	14080±1077	6434±1094
Timo	Hembras	1210±108	480±42	435±69
	Machos	1088±118	307±41	407±36
Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)				
Bazo	Hembras	32±5	38±4	33±3
	Machos	29±5	35±2	31±1
Timo	Hembras	46±8	54±2	45±2
	Machos	36±4	52±2	13±2

Se muestra la media ± el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

hembras y machos adultos, mientras que el aumento debido a la edad ($P<0,001$ tanto en hembras como en machos) tendió a ser mayor en hembras que en machos viejos para la quimiotaxis de linfocitos esplénicos, hecho que se hizo significativo en el timo ($P<0,01$) (Fig. 66A,B).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer en individuos viejos, ésta tuvo un efecto general aumentando la función quimiotáctica de los linfocitos de bazo y timo en relación a los valores en viejos no transgénicos ($P<0,001$). Considerando únicamente la variable sexo, se observó de forma general una mayor quimiotaxis en las hembras que en los machos para ambas localizaciones ($P<0,001$). De manera interesante, el Alzheimer tuvo un efecto diferencial sobre esta función dependiendo del sexo ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente). De esta forma, el análisis estadístico profundo reveló que el aumento en la función quimiotáctica en individuos viejos debido a esta enfermedad se produce sólo en las hembras ($P<0,001$) (Fig. 66A,B).

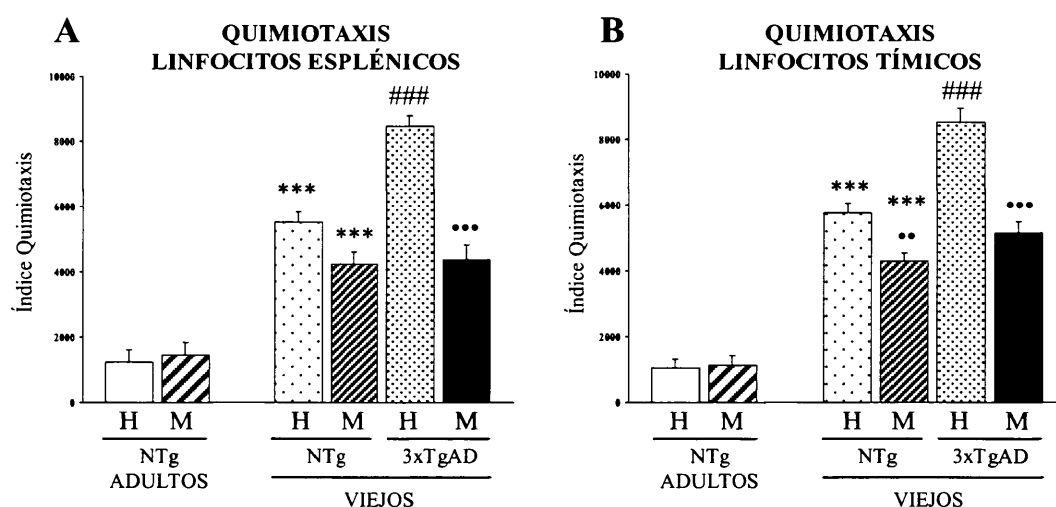


Figura 66. Índice de quimiotaxis (número de células) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-10 adultos y viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; ### $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos del mismo sexo; *** $P<0,001$, ** $P<0,01$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

En relación a la **proliferación de linfocitos esplénicos**, no se observaron diferencias entre los grupos considerados, ni en estado de reposo ni en respuesta al mitógeno concanavalina A, si bien a nivel basal se observó una tendencia hacia mayores niveles en las hembras que en los machos no transgénicos.

En controles no transgénicos, se observó un efecto general de la edad aumentando la linfoproliferación inducida por lipopolisacárido ($P<0,001$). Este aumento debido a la edad se produjo de forma similar tanto en hembras como en machos viejos no transgénicos ($P<0,001$), mostrando ambos grupos valores similares (Fig. 67A).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer en individuos viejos, ésta tuvo un efecto general disminuyendo la función proliferativa de los linfocitos esplénicos en respuesta a lipopolisacárido en relación a los valores en viejos no transgénicos ($P<0,001$). Considerando únicamente la variable sexo, se observó de forma general una mayor proliferación en las hembras que en los machos ($P<0,01$). De manera interesante, el Alzheimer tuvo un efecto diferencial sobre esta función dependiendo del sexo ($P<0,01$). Así, el análisis estadístico profundo reveló que la disminución en la función proliferativa en individuos viejos debido a esta enfermedad se produce sólo en los machos ($P<0,001$), mostrando éstos valores menores a los de las hembras de su misma condición ($P<0,01$) (Fig. 67A).

En el caso de la **proliferación de linfocitos procedentes de timo**, se observó un efecto general de la edad disminuyendo esta función ($P<0,001$), tanto en hembras como en machos ($P<0,001$) y en todas las condiciones experimentales estudiadas.

La enfermedad de Alzheimer en individuos viejos tuvo un efecto general aumentando la función proliferativa de los linfocitos tímicos en reposo en comparación con los valores en viejos no transgénicos ($P<0,05$). Considerando únicamente la variable sexo, se observó de forma general una mayor proliferación basal en las hembras que en los machos ($P<0,05$). No obstante, el análisis estadístico profundo no reveló diferencias significativas entre ninguno de los grupos considerados individualmente, mostrando valores similares hembras y machos viejos no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Fig. 67B).

En el caso de la proliferación de linfocitos tímicos inducida por concanavalina A en controles no transgénicos, las hembras mostraron globalmente mayores valores que los machos ($P<0,05$), mientras que ambos sexos respondieron con valores similares en respuesta a lipopolisacárido. No obstante, en ambos casos, el análisis estadístico posterior

Por otra parte, el efecto de la enfermedad de Alzheimer en viejos dependió del género de los individuos en el caso de la respuesta a concanavalina A ($P<0,01$), siendo nulo en las hembras y estimulador en el caso de los machos con respecto a sus congéneres no transgénicos de la misma edad ($P<0,05$). Así, hembras y machos viejos transgénicos mostraron valores similares de proliferación de linfocitos tímicos en respuesta a concanavalina A.

En el caso del lipopolisacárido, existió una tendencia hacia mayores niveles de respuesta en hembras viejas no transgénicas y triple transgénicas para la enfermedad de Alzheimer que en machos. El Alzheimer no produjo efecto alguno sobre esta respuesta, si bien hembras y machos mostraron valores similares (Fig. 67B).

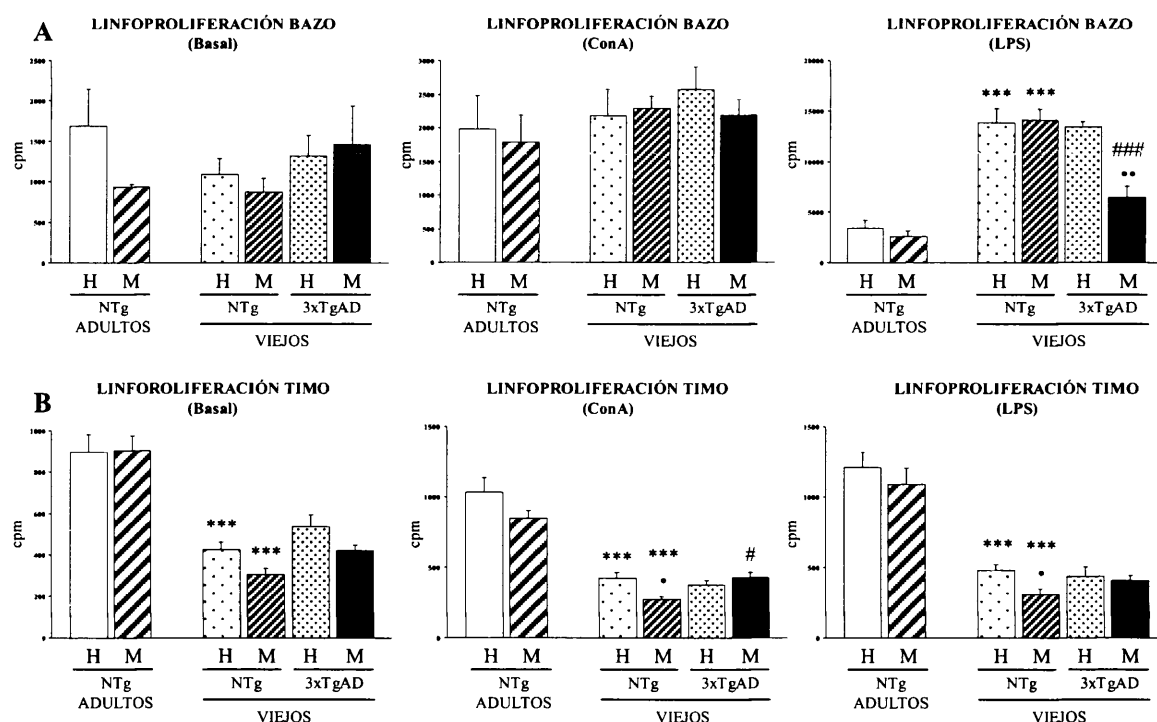


Figura 67. Proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B) no estimulados (basal) y estimulados con concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7-13 adultos no transgénicos; 9-10 viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos del mismo sexo; ** $P < 0,01$, • $P < 0,05$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Con respecto a la **citotoxicidad natural de los linfocitos esplénicos**, los valores de esta función en dicha localización fueron similares en todos los grupos considerados (Fig. 68A).

En controles no transgénicos, se observó un efecto general de la edad aumentando la **actividad NK de los linfocitos tímicos** ($P<0,01$). No obstante, el análisis estadístico posterior reveló que este aumento se produce de forma significativa únicamente en machos ($P<0,05$).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer en individuos viejos, ésta tuvo un efecto general disminuyendo la función NK de los linfocitos de timo en relación a los valores en viejos no transgénicos ($P<0,001$). Considerando la variable sexo de forma independiente, se observó una menor función citotóxica en dicha localización en machos con respecto a hembras ($P<0,001$). Nuevamente, el Alzheimer tuvo un efecto diferencial dependiendo del sexo ($P<0,001$). De esta forma, el análisis estadístico profundo reveló que la disminución en la actividad NK de los linfocitos de timo debida a esta enfermedad es mayor en machos que en hembras ($P<0,001$ y $P<0,05$ con respecto a los valores en viejos no transgénicos del mismo sexo, respectivamente). Así, si bien los valores eran similares en hembras y machos viejos no transgénicos, éstos fueron significativamente menores ($P<0,001$) en los machos que en las hembras triple transgénicos (Fig. 68B).

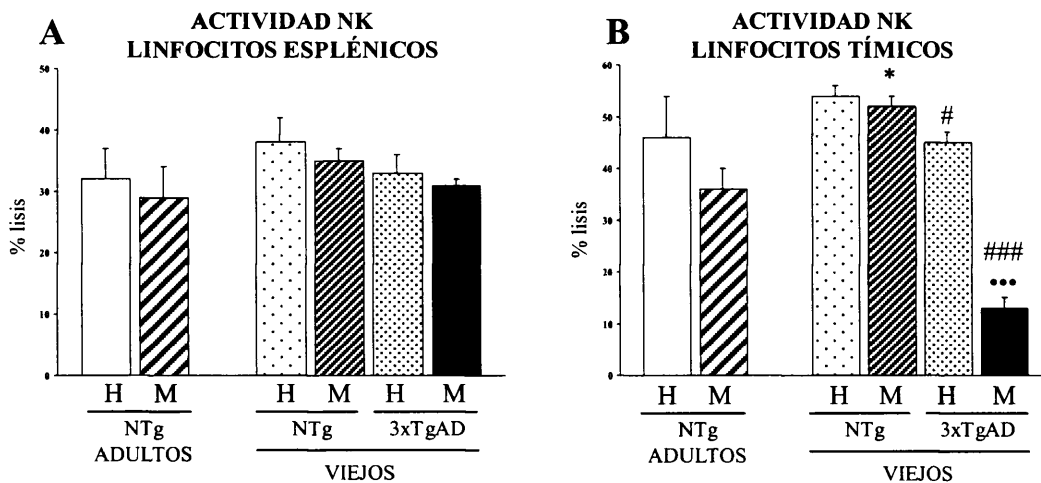


Figura 68. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7-9 adultos no transgénicos; 9-10 viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; ### $P<0,001$, # $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos del mismo sexo; ... $P<0,001$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

4.1.3.2. Citoquinas: *Interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral α* .

La tabla 24 y la figura 69 muestran los resultados obtenidos con respecto a los niveles de IL-2 inducidos por concanavalina A y de TNF- α estimulados por lipopolisacárido en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos esplénicos y tímicos.

Tabla 24. Niveles (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, y de TNF- α en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Niveles de citoquinas (pg/ml)		Adultos NTg	Viejos	
			NTg	3xTgAD
IL-2				
Bazo	Hembras	32±6	37±5	60±4
	Machos	52±6	62±7	31±6
Timo	Hembras	24±2	17±2	16±2
	Machos	20±2	19±2	20±3
TNF-α				
Bazo	Hembras	104±7	104±3	157±12
	Machos	97±4	99±5	155±14
Timo	Hembras	97±2	109±3	121±6
	Machos	90±2	108±3	105±5

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Con respecto a los niveles de **IL-2 en sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos** de controles no transgénicos, se observó un efecto general del sexo ($P<0,001$), siendo los valores mayores en machos que en hembras. El análisis estadístico posterior reveló que tales diferencias por género sólo eran significativas en los individuos viejos ($P<0,01$). Por otra parte, la enfermedad de Alzheimer en viejos tuvo un efecto diferencial dependiendo del sexo ($P<0,001$), aumentando los niveles de dicha citoquina en las hembras ($P<0,05$) y disminuyéndolos en los machos ($P<0,01$). Así, los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos esplénicos procedentes de machos viejos triple transgénicos fueron significativamente menores que los de las hembras del mismo grupo ($P<0,01$) (Fig. 69A).

En el caso del **timo**, se observó un efecto general de la edad ($P<0,05$) disminuyendo los valores de IL-2, pero el análisis estadístico posterior dio a conocer que

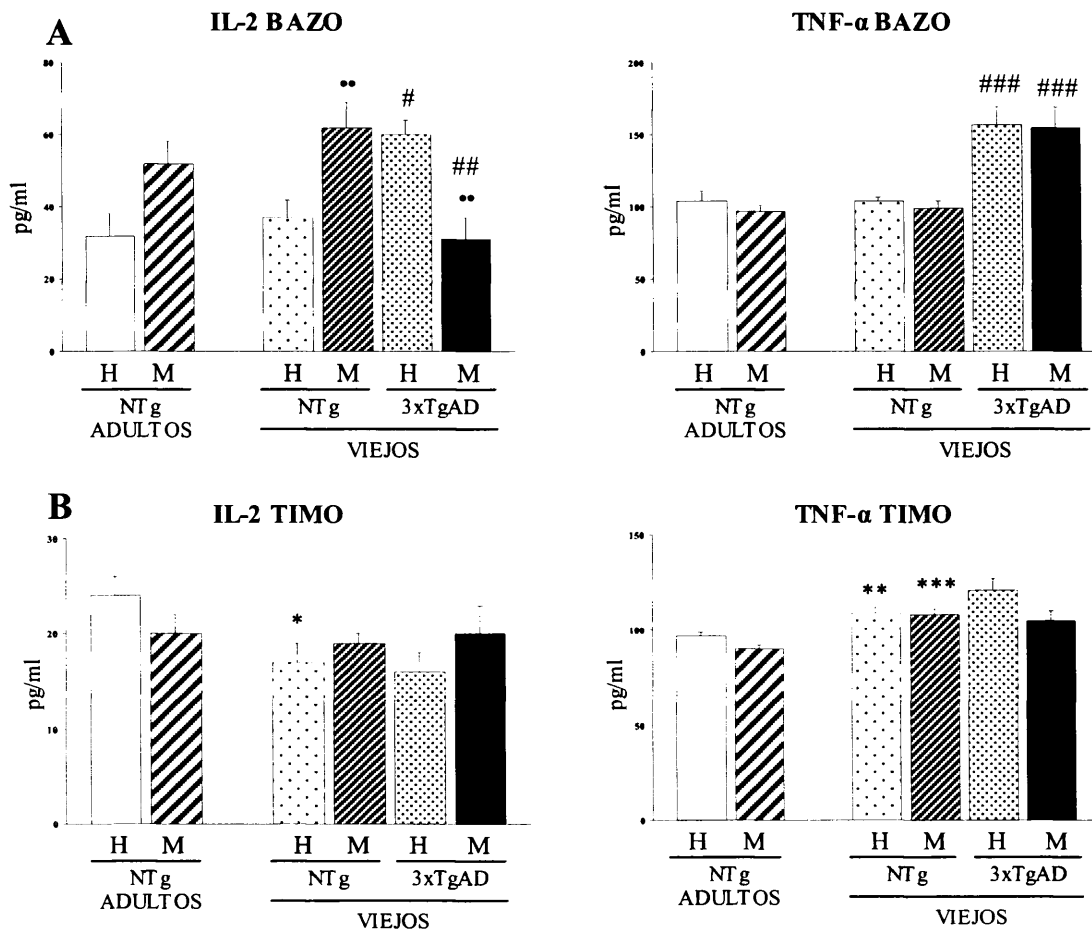


Figura 69. Niveles (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, y de TNF- α en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-13 adultos no transgénicos; 9-10 viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos del mismo sexo; ** $P < 0,01$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

dicho efecto sólo era significativo en el caso de las hembras ($P < 0,01$). Los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos tímicos fueron similares en hembras y machos viejos no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Fig. 69B).

Además, los niveles de **TNF- α en sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos** fueron similares en hembras y machos adultos y viejos no transgénicos. No obstante, la enfermedad de Alzheimer en viejos produjo un aumento general en los niveles de dicha citoquina pro-inflamatoria ($P < 0,001$), tanto en hembras como en machos ($P < 0,001$), de manera que todos los individuos viejos triple transgénicos, con

independencia del género, presentaron similares niveles, aumentados con respecto a los valores en animales viejos control (Fig. 69A).

En el caso del **tímo**, la edad produjo un aumento general en los valores de TNF- α ($P<0,001$), que fue más significativo en los machos ($P<0,001$) que en las hembras ($P<0,01$), pero presentando ambos sexos niveles similares tanto en el grupo adulto como en el viejo. Los sujetos viejos triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer mostraron niveles similares de TNF- α a los presentes en viejos control (Fig. 69B).

4.1.3.2. Defensa antioxidante: *Niveles intralinfocitarios de glutatión total.*

La tabla 25 y la figura 70 muestran los resultados obtenidos en relación al contenido en glutatión total (GSH) de linfocitos esplénicos y tímicos.

Tabla 25. Valores de glutatión (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

GSH linfocitos (nmol/mg proteína)		Adultos NTg	Viejos	
			NTg	3xTgAD
Bazo	Hembras	28,51 \pm 2,76	9,97 \pm 1,99	12,01 \pm 2,60
	Machos	27,73 \pm 3,78	2,43 \pm 0,31	3,41 \pm 0,34
Tímo	Hembras	13,93 \pm 1,63	2,05 \pm 0,30	1,92 \pm 0,34
	Machos	12,71 \pm 1,74	2,34 \pm 0,31	2,82 \pm 0,66

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

En controles no transgénicos, se observó un efecto general de la edad disminuyendo el contenido en GSH de los linfocitos esplénicos y tímicos ($P<0,001$). El análisis estadístico posterior reveló valores similares en hembras y machos adultos. La disminución debida a la edad ($P<0,001$ tanto en hembras como en machos) fue mayor en machos que en hembras viejos para los niveles de GSH en linfocitos esplénicos ($P<0,05$), y similar para ambos sexos en el caso del tímo (Fig. 70A,B).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer en individuos viejos, no se observaron diferencias en relación a los valores en viejos no transgénicos (Fig. 70A,B).

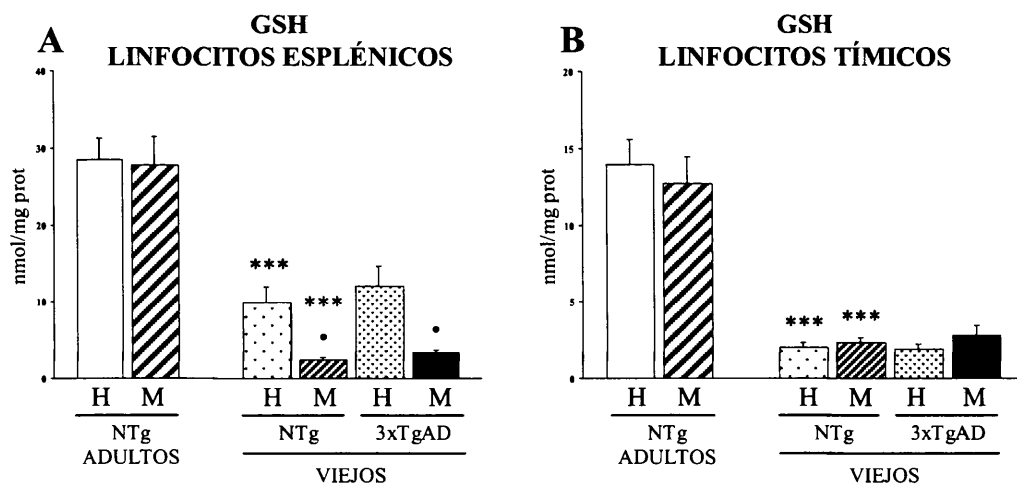


Figura 70. Valores de glutatión (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (13-14 adultos no transgénicos; 6-10 viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; * $P < 0,05$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

4.1.3.3. Niveles plasmáticos de corticosterona.

La tabla 26 y la figura 71 muestran los resultados obtenidos en cuanto a los niveles plasmáticos de corticosterona.

Tabla 26. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml).

Corticosterona (ng/ml)	Adultos NTg	Viejos	
		NTg	3xTgAD
Hembras	181,30 \pm 13,69	62,80 \pm 5,95	58,79 \pm 9,54
Machos	21,86 \pm 1,62	21,90 \pm 4,76	79,60 \pm 5,07

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

En controles no transgénicos, se observó un efecto general de la edad, de manera que los niveles de corticosterona en plasma fueron mayores en adultos que en viejos ($P < 0,001$). Considerando la variable sexo de forma independiente, las hembras mostraron mayores valores que los machos ($P < 0,001$). De manera interesante, la edad tuvo un efecto diferencial en función del sexo ($P < 0,001$). Así, el análisis estadístico más exhaustivo reveló

valores mayores en hembras que machos adultos ($P<0,001$), mientras que la disminución debida a la edad se produjo únicamente en las hembras ($P<0,001$), pero no en los machos. No obstante, en viejos no transgénicos, las hembras siguieron mostrando mayores niveles de corticosterona plasmática que los machos ($P<0,001$) (Fig. 71).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer en individuos viejos, ésta tuvo un efecto general aumentando la corticosterona en plasma ($P<0,001$). Este efecto fue diferencial dependiendo del sexo ($P<0,001$), de forma que el aumento en los niveles de corticosterona plasmática en viejos triple transgénicos en relación a los individuos de la cepa salvaje de la misma edad se produjo sólo en los machos ($P<0,001$), y no en las hembras. Así, todos los viejos triple transgénicos mostraron valores similares con independencia de su género (Fig. 71).

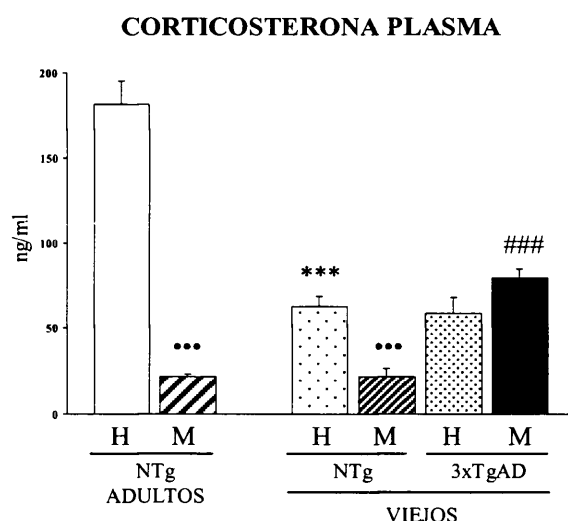


Figura 71. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos no transgénicos; 8-10 viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de adultos no transgénicos del mismo sexo; ### $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos del mismo sexo; *** $P<0,001$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

4.2. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.

4.2.1. Antioxidantes.

Efecto de la N-acetilcisteína sobre la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y el estado redox en mujeres postmenopáusicas

4.2.1.1. Capacidad funcional de los leucocitos.

4.2.1.1.1. Neutrófilos: *Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.*

Los resultados obtenidos en relación a la función de neutrófilos en mujeres de 30-49 años, y en mujeres postmenopáusicas de más de 49 años antes y después de la administración de N-acetilcisteína (NAC), se muestran en la tabla 27 y en la figura 72.

La comparación de los valores obtenidos en mujeres de 30-49 años y previos al tratamiento en mujeres de 50-69 años y mayores de 69, reveló un efecto general de la edad disminuyendo las capacidades quimiotáctica y fagocítica ($P<0,001$) de los neutrófilos, y aumentando los niveles de anión superóxido en estas mismas células tanto en estado basal ($P<0,001$) como en presencia de estímulo ($P<0,05$). Estos cambios se observaron ya mayoritariamente a partir de la década de los 50 y se mantuvieron en la de los 70, siendo más relevantes en esta última sólo en el caso de los niveles de anión superóxido, y especialmente a nivel basal (Fig. 72D). La capacidad de adherencia de neutrófilos no mostró cambios a lo largo de la edad.

La administración de NAC produjo una disminución en la **adhesión** de los neutrófilos (Fig. 72A), que se observó a los 2 meses de tratamiento tanto en la década de los 50 ($P<0,01$) como en la de los 70 ($P<0,001$), y fue más relevante a los 4 meses ($P<0,001$). El efecto se mantuvo 3 meses después de finalizar el tratamiento ($P<0,05$). En ambos grupos de mujeres postmenopáusicas, a lo largo del tratamiento la adherencia alcanzó valores por debajo de los obtenidos en el grupo control de edad adulta (30-49 años) (ej. $P<0,001$ con 4 meses de NAC).

Tabla 27. Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos), y niveles de anión superóxido en muestras no estimuladas y estimuladas (nmol/10⁶ neutrófilos) de neutrófilos humanos procedentes de sangre periférica de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización.

Función neutrófilos	Previo NAC	2 meses NAC	4 meses NAC	3 meses tras NAC
Índice adherencia (% neutrófilos adherentes)				
30-49 años	45±2			
50-69 años	43±4	29±2	23±2	33±3
≥ 70 años	46±5	31±3	25±2	30±4
Índice quimiotaxis (nº neutrófilos)				
30-49 años	591±13			
50-69 años	372±30	448±31	633±51	767±41
≥ 70 años	353±34	595±41	650±43	762±47
Índice fagocitosis (nº bolas de látex/100 neutrófilos)				
30-49 años	402±50			
50-69 años	105±18	151±19	222±17	192±27
≥ 70 años	82±15	156±26	195±14	175±17
Anión superóxido no estimulado (nmol/10⁶ neutrófilos)				
30-49 años	39±2			
50-69 años	49±5	38±2	37±3	48±5
≥ 70 años	61±4	48±5	42±5	47±3
Anión superóxido estimulado (nmol/10⁶ neutrófilos)				
30-49 años	65±4			
50-69 años	82±7	53±3	52±3	69±6
≥ 70 años	88±6	70±6	58±6	66±5

Se muestra la media ± el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

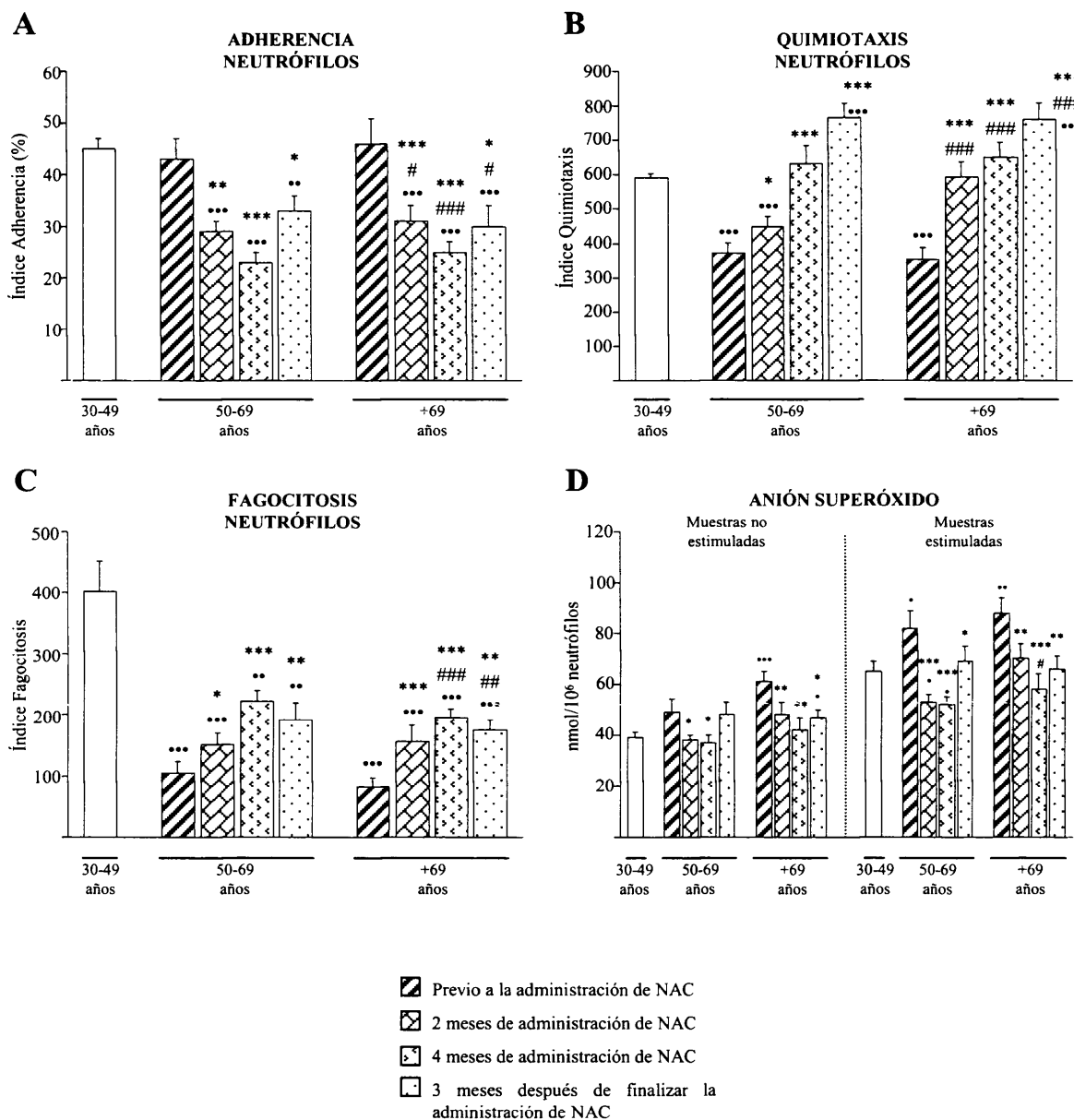
Dicha disminución en la adherencia fue coincidente con el aumento progresivo en la **capacidad quimiotáctica** de estas células (Fig. 72B), que se apreció a los 2 meses del inicio de la administración de NAC tanto en mujeres de 50-69 ($P<0,05$) años como en las mayores de 69 ($P<0,001$), y fue más relevante con 4 meses de tratamiento ($P<0,001$) e incluso 3 meses después de terminada la administración ($P<0,001$). La quimiotaxis de neutrófilos en mujeres postmenopáusicas llegó a igualar a la de mujeres de 30-49 años tras 2 o 4 meses de administración oral de NAC (en mujeres mayores de 69 y en las de 50-69, respectivamente), e incluso la superó 3 meses después de finalizada ($P<0,001$ en mujeres de 50-69 años, $P<0,01$ en las de más de 69).

La **capacidad fagocítica** de los neutrófilos también se vio mejorada como consecuencia de la administración de NAC (Fig. 72C), apareciendo aumentada ya a los 2 meses de tratamiento tanto en mujeres de 50-69 años ($P<0,05$) como en las de más de 69 ($P<0,001$), y con mayor relevancia a los 4 meses ($P<0,001$). Este efecto se mantuvo 3 meses después de terminar el tratamiento ($P<0,01$). Los valores de esta función se aproximaron a los de personas más jóvenes gracias a la ingesta del antioxidante ($P<0,001$ en mujeres de 50-69 años previo al tratamiento, $P<0,01$ con 4 meses de NAC).

Con respecto a los niveles intracelulares de **anión superóxido** en estado de reposo de los neutrófilos (Fig. 72D), se observó una disminución de los mismos detectable ya a los 2 meses de tratamiento de NAC, que se mantuvo a los 4 meses. Tal disminución fue más significativa en las mujeres mayores de 69 años ($P<0,01$) que en las de 50-69 ($P<0,05$), siendo aquéllas por otra parte las que presentaron niveles iniciales más aumentados ($P<0,001$). El efecto beneficioso se mantuvo en ellas 3 meses después de la finalización del tratamiento ($P<0,05$). Los niveles de superóxido en estado basal de mujeres postmenopáusicas se igualaron a los de mujeres más jóvenes como consecuencia de la suplementación con el antioxidante.

La figura 72D muestra también los resultados obtenidos en relación a los niveles intracelulares de superóxido en neutrófilos estimulados. Dichos niveles disminuyeron con 2 meses de administración de NAC tanto en mujeres postmenopáusicas de 50-69 años ($P<0,001$) como en las mayores de 69 ($P<0,01$), hecho que se hizo más relevante con 4 meses de tratamiento ($P<0,001$). El efecto se mantuvo en ambos grupos de edad ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente). Los niveles de anión superóxido estimulados en mujeres postmenopáusicas se aproximaron e igualaron a los de mujeres más jóvenes gracias al

tratamiento (mujeres de más de 69 años), e incluso alcanzaron niveles por debajo de los encontrados en éstas ($P<0,05$, mujeres de 50-69 años).



4.2.1.1.2. Linfocitos: *Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK*

Los resultados correspondientes a la función linfocitaria en mujeres de 30-49 años, y en mujeres postmenopáusicas de más de 49 años antes y después de la administración de NAC, se muestran en la tabla 28 y en la figura 73.

La comparación de los valores obtenidos en mujeres de 30-49 años y previos al tratamiento en mujeres de 50-69 años y mayores de 69, mostró un efecto general de la edad disminuyendo las capacidades quimiotáctica, proliferativa en respuesta a mitógenos y citotóxica ($P<0,001$) de los leucocitos mononucleares. Estas diferencias se observaron ya a partir de la década de los 50 y se mantuvieron en la de los 70, siendo más relevantes en esta última sólo en el caso de la linfoproliferación en respuesta a PHA (Fig. 73C). La capacidad de adherencia de los linfocitos no mostró cambios a lo largo de la edad.

El tratamiento con NAC condujo a una disminución en la **adhesión** de los linfocitos (Fig. 73A), que se observó a los 2 meses de tratamiento tanto en la década de los 50 ($P<0,05$) como en la de los 70 ($P<0,01$), y fue más significativa a los 4 meses ($P<0,001$). El efecto se mantuvo 3 meses después de finalizar el tratamiento en las mujeres mayores de 69 años ($P<0,05$). En ambos grupos de mujeres postmenopáusicas, la adherencia alcanzó valores por debajo de los obtenidos en el grupo control de edad adulta (30-49 años), con 4 meses de administración de NAC ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente).

De manera similar a lo anteriormente expuesto para el caso de los neutrófilos, la disminución en la adherencia de los linfocitos fue coincidente con el aumento progresivo en su **capacidad quimiotáctica** a lo largo del tratamiento (Fig. 73B), que se apreció a los 2 meses del inicio de la administración de NAC en ambos grupos de edad ($P<0,001$), y fue más relevante con 4 meses ($P<0,001$). El efecto se mantuvo 3 meses después de terminada la administración ($P<0,001$ y $P<0,05$, respectivamente). Por otra parte, la capacidad de quimiotaxis de linfocitos en mujeres postmenopáusicas igualó a la de mujeres de 30-49 años tras 2 meses de suplementación con NAC en las de 50-69 años, y llegó a superarla con 4 meses de administración del antioxidante en ambos grupos experimentales ($P<0,001$ en mujeres de 50-69 años, $P<0,05$ en las de más de 69). Esta función se mantuvo al nivel de personas más jóvenes 3 meses después de concluido el tratamiento.

Además, la **capacidad proliferativa** de los linfocitos en respuesta a PHA se vio mejorada de manera progresiva como consecuencia de la administración de NAC (Fig. 73C), apareciendo aumentada ya a los 2 meses de tratamiento tanto en mujeres de 50-69

Tabla 28. Índice de adherencia (% linfocitos adherentes), índice de quimiotaxis (número de linfocitos), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) y actividad *Natural Killer* (% lisis) de linfocitos humanos procedentes de sangre periférica de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización.

Función linfocitos	Previo NAC	2 meses NAC	4 meses NAC	3 meses tras NAC
Índice adherencia (% linfocitos adherentes)				
30-49 años	46±3			
50-69 años	46±4	39±4	28±2	43±4
≥ 70 años	51±4	41±4	34±2	40±4
Índice quimiotaxis (n° linfocitos)				
30-49 años	403±23			
50-69 años	220±20	351±25	628±35	347±31
≥ 70 años	214±26	308±29	563±62	352±45
Proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto)				
30-49 años	43594±1162			
50-69 años	16972±2074	23060±1961	27088±1765	32116±2759
≥ 70 años	6722±1383	12129±1816	18383±2416	24218±3324
Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)				
30-49 años	60±2			
50-69 años	23±3	34±3	50±4	34±3
≥ 70 años	15±2	28±3	42±4	38±4

Se muestra la media ± el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

años ($P<0,05$) como en las de más de 69 ($P<0,01$), y con mayor relevancia a los 4 meses ($P<0,001$) e incluso 3 meses después de terminar la suplementación ($P<0,001$). Los valores de esta función se aproximaron a los de personas más jóvenes gracias a la ingesta del antioxidante. Así, por ejemplo, la linfoproliferación de mujeres mayores de 69 años igualó a la de las mujeres de 50-69 ya con 2 meses de NAC, manteniéndose a ese nivel a lo largo de todo el estudio. Por su parte, la función linfoproliferativa en mujeres de 50-69 años también se aproximó progresivamente a la de las mujeres de 30-49 ($P<0,001$ a nivel inicial, $P<0,01$ tras 3 meses de finalizar la administración de NAC).

Por último, en relación a la actividad citotóxica de los leucocitos mononucleares (Fig. 73D), se observó un aumento de esta función ya a los 2 meses de tratamiento con NAC tanto en las mujeres de 50-69 años ($P<0,01$) como en las mayores de 69 ($P<0,001$), que fue más relevante a los 4 meses ($P<0,001$). El efecto beneficioso se mantuvo 3 meses

después de la finalización del tratamiento ($P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente). La función NK de los leucocitos mononucleares de mujeres postmenopáusicas se aproximó a la de mujeres más jóvenes de 30-49 años gracias a la suplementación con el antioxidante ($P<0,001$ a nivel inicial en mujeres de 50-69 años, $P<0,05$ con 4 meses de NAC).

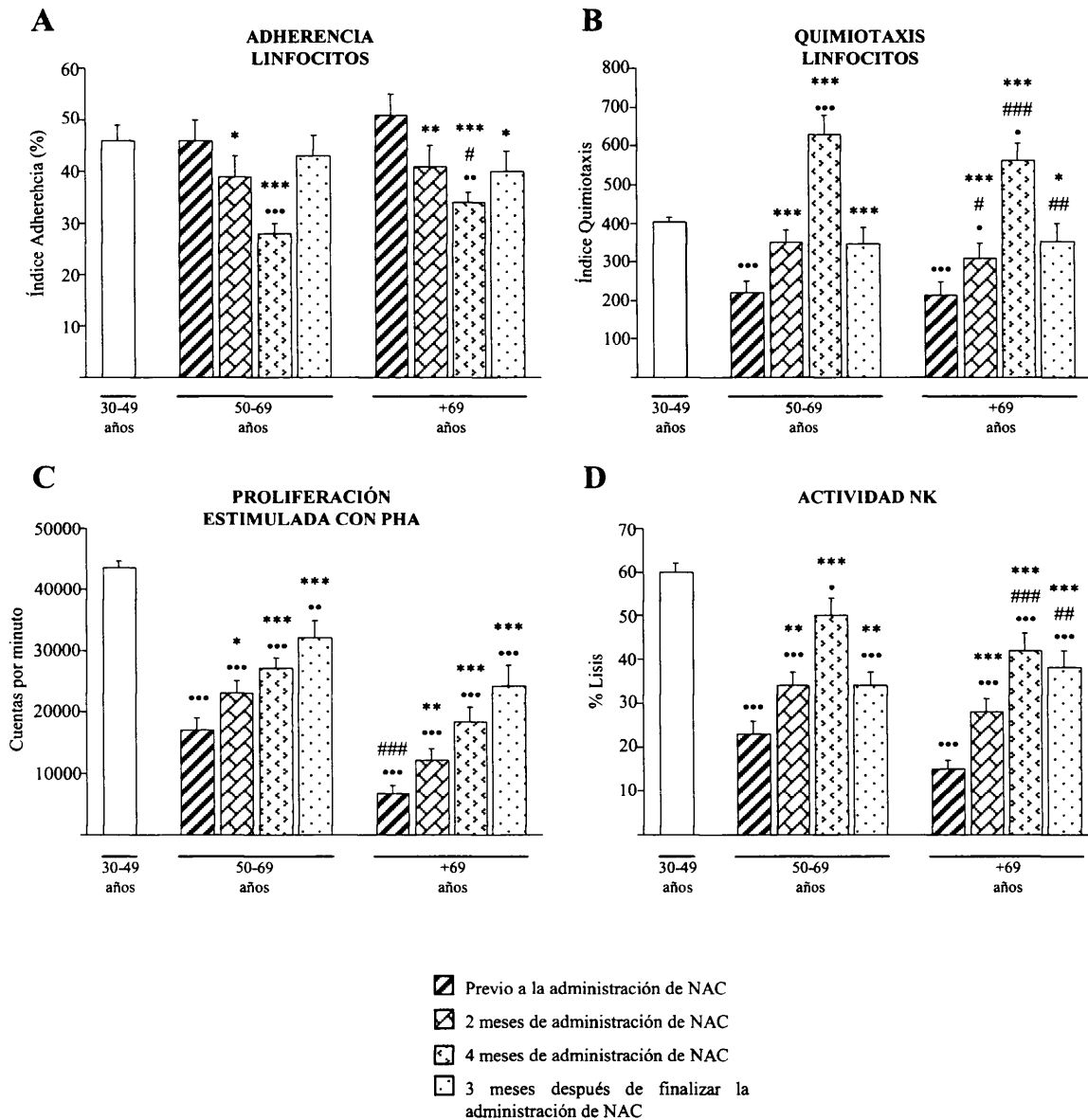


Figura 73. Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos) (B), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) (C) y actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) (D) de linfocitos humanos procedentes de sangre periférica de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor obtenido antes de iniciarse el tratamiento. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 30-49 años. ### $P<0,001$, ## $P<0,01$, # $P<0,05$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 50-69 años.

4.2.1.1.3. Citoquinas: *Interleuquina 2, factor de necrosis tumoral α e interleuquina 8.*

Los resultados correspondientes a los niveles de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de leucocitos mononucleares estimulados con PHA, y de TNF- α e IL-8 en sobrenadantes de cultivos de sangre total estimulados con LPS de mujeres de 30-49 años, y de mujeres postmenopáusicas de más de 49 años antes y después de la administración de NAC, se presentan en la tabla 29 y en la figura 74.

Tabla 29. Niveles de IL-2 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de linfocitos procedentes de sangre periférica humana estimulados con PHA, y de TNF- α (pg/ml) e IL-8 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS, de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización.

Niveles de citoquinas (pg/ml)	Previo NAC	2 meses NAC	4 meses NAC	3 meses tras NAC
IL-2				
30-49 años	268 \pm 16			
50-69 años	228 \pm 23	278 \pm 18	295 \pm 19	256 \pm 21
≥ 70 años	138 \pm 25	217 \pm 26	251 \pm 28	232 \pm 23
TNF-α				
30-49 años	988 \pm 42			
50-69 años	1111 \pm 53	910 \pm 53	791 \pm 53	855 \pm 45
≥ 70 años	1116 \pm 40	893 \pm 43	827 \pm 42	904 \pm 27
IL-8				
30-49 años	2620 \pm 100			
50-69 años	2773 \pm 177	2462 \pm 195	1963 \pm 178	2282 \pm 178
≥ 70 años	2796 \pm 120	2425 \pm 156	2240 \pm 169	2579 \pm 116

Se muestra la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Con respecto a la comparación de los valores obtenidos en mujeres de 30-49 años y previos al tratamiento en mujeres de 50-69 años y mayores de 69, ésta reveló un efecto general de la edad disminuyendo los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados con PHA ($P < 0,001$), que se produjo a partir de la década de los 70 (Fig. 74A). Por otra parte, si bien no existió un efecto significativo general de la edad en los niveles de TNF- α de los sobrenadantes de cultivo de sangre total en presencia de LPS, se

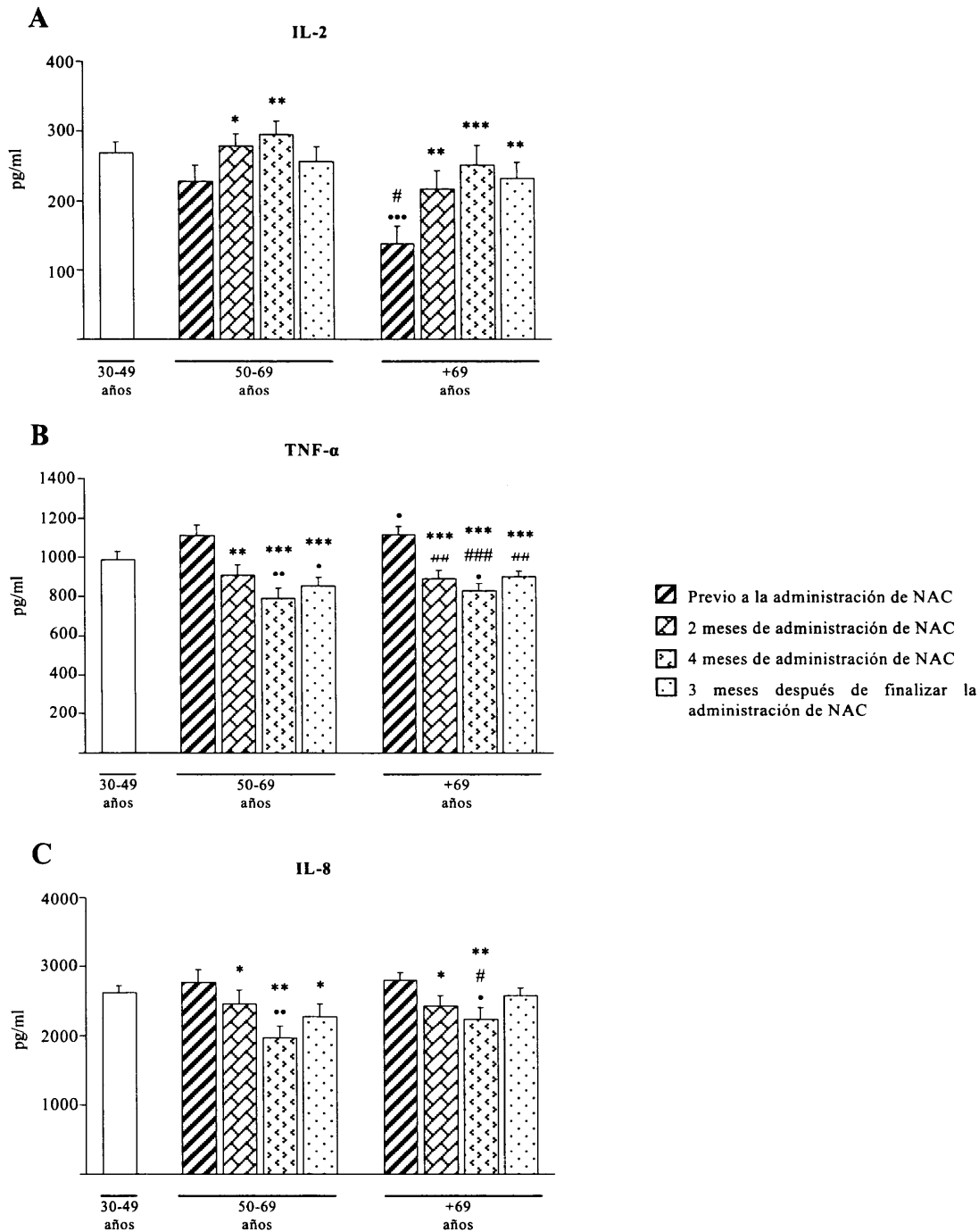


Figura 74. Niveles de IL-2 (pg/ml) (A) en sobrenadantes de cultivo de linfocitos procedentes de sangre periférica humana estimulados con PHA, y de TNF-α (pg/ml) (B) e IL-8 (pg/ml) (C) en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con LPS, de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor obtenido antes de iniciarse el tratamiento. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, • $P < 0,05$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 30-49 años. ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 50-69 años.

observó una tendencia al aumento, significativa a partir de la década de los 70 ($P<0,05$) (Fig. 74B). La valoración de IL-8 en estas mismas muestras no mostró cambios en los niveles de esta citoquina en función de la edad (Fig. 74C).

El tratamiento con NAC condujo a un aumento en los niveles de **IL-2** en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos (Fig. 74A), que se observó a los 2 meses de tratamiento tanto en la década de los 50 ($P<0,05$) como en la de los 70 ($P<0,01$), y fue más relevante a los 4 meses ($P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente). El efecto se mantuvo 3 meses después de finalizar el tratamiento en las mujeres mayores de 69 años ($P<0,01$). Éstas alcanzaron valores de IL-2 similares a los de mujeres más jóvenes gracias a la administración de NAC, a lo largo de todo el estudio.

Con respecto a los niveles de **TNF- α** en los sobrenadantes de cultivos de sangre total estimulados con LPS (Fig. 74B), se observó una disminución de los mismos a los 2 meses de tratamiento con NAC tanto en las mujeres de 50-69 años ($P<0,01$) como en las mayores de 69 ($P<0,001$), que se mantuvo con 4 meses de administración y 3 meses después de la finalización de la misma ($P<0,001$). El TNF- α alcanzó en las mujeres mayores de 69 años los valores de las de 30-49 gracias a la suplementación con el antioxidante, e incluso disminuyó por debajo de los mismos a los 4 meses de administración de NAC ($P<0,05$). En las mujeres de 50-69 años, los niveles de TNF- α también fueron menores que los de las mujeres de 30-49, con 4 meses de administración de NAC ($P<0,01$) y 3 meses después de terminar el tratamiento ($P<0,05$).

Por último, la administración de NAC produjo una disminución en los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de sangre total en presencia de LPS (Fig. 74C), que se observó a los 2 meses de tratamiento en ambos grupos de edad ($P<0,05$), y fue más relevante a los 4 meses ($P<0,01$). El efecto se mantuvo 3 meses después de finalizar el tratamiento en las mujeres de 50-69 años ($P<0,05$). En las mujeres de 50-69 años, los niveles de IL-8 fueron menores que los de las mujeres de 30-49, con 4 meses de administración de NAC ($P<0,01$), mientras que en las mayores de 69 y en ese mismo punto del estudio alcanzaron valores por debajo de los presentes tanto en las mujeres de la década de los 50 como en las de 30 ($P<0,05$).

4.2.1.2. Estado redox de leucocitos y plasma.

4.2.1.2.1. Defensa antioxidante: *Niveles de glutathion total en linfocitos, neutrófilos y plasma.*

Los resultados obtenidos en relación al contenido intracelular de glutathion (GSH) en linfocitos y neutrófilos así como los niveles de este antioxidante circulantes en plasma de mujeres de 30-49 años, y de mujeres postmenopáusicas de más de 49 años antes y después de la administración de NAC, se muestran en la tabla 30 y en la figura 75.

Tabla 30. Valores de glutathion (GSH) en linfocitos (nmol/10⁶ linfocitos) (A), neutrófilos (nmol/10⁶ neutrófilos) (B) y plasma (μM) (C) de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización.

GSH	Previo NAC	2 meses NAC	4 meses NAC	3 meses tras NAC
Linfocitos (nmol/10⁶ linfocitos)				
30-49 años	1,94±0,13			
50-69 años	0,49±0,04	0,60±0,06	0,79±0,09	1,11±0,15
≥ 70 años	0,84±0,11	0,91±0,10	1,09±0,09	1,21±0,11
Neutrófilos (nmol/10⁶ neutrófilos)				
30-49 años	1,30±0,14**			
50-69 años	0,20±0,02***	0,31±0,04	0,57±0,08	0,53±0,07
≥ 70 años	0,23±0,02***	0,33±0,05	0,67±0,12	0,51±0,07
Plasma (μM)				
30-49 años	8,59±0,26			
50-69 años	7,11±0,24	7,20±0,33	7,14±0,19	7,26±0,26
≥ 70 años	6,85±0,29	7,14±0,24	7,38±0,25	7,22±0,33

Se muestra la media ± el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos.

*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido en linfocitos.

En cuanto a la comparación de los valores obtenidos en mujeres de 30-49 años y previos al tratamiento en mujeres de 50-69 años y mayores de 69, ésta reveló un efecto general de la edad disminuyendo tanto el contenido intracelular de GSH en linfocitos y neutrófilos como los niveles circulantes en plasma ($P < 0,001$). Tales cambios se observaron ya a partir de la década de los 50 y se mantuvieron en la de los 70. No obstante, los linfocitos de mujeres mayores de 69 años presentaron mayor contenido en GSH que las de

50-69 años ($P<0,01$) (Fig. 75A,B). En la tabla 30 se muestra además que los linfocitos presentaron mayores niveles de GSH que los neutrófilos ya en la edad adulta ($P<0,01$), diferencias que aumentaron con el envejecimiento a partir de la década de los 50 ($P<0,001$).

La administración de NAC produjo un aumento en los niveles de glutathion intracelular de linfocitos y neutrófilos (Fig. 75A,B), efecto que no se vio reflejado en plasma (Fig. 75C). El aumento del glutathion en las células inmunitarias se apreció ya a los 2 meses de tratamiento ($P<0,01$ en los linfocitos y en los neutrófilos de las mujeres de 50-60 años, y $P<0,05$ en los neutrófilos de las mayores de 69). Esas diferencias en el aumento de los niveles de glutathion se hicieron más relevantes a los 4 meses del tratamiento ($P<0,001$ en neutrófilos de las dos edades estudiadas y en linfocitos de mujeres de 50-69, y $P<0,05$ en los linfocitos de mujeres mayores de 69). Trascurridos 3 meses de la finalización de la administración de NAC, se siguió apareciendo un aumento estadísticamente significativo en relación con el valor previo al inicio del tratamiento en los linfocitos y neutrófilos de mujeres de 50-69 ($P<0,001$) y de mayores de 69 años ($P<0,05$ en y $P<0,01$, respectivamente).

4.2.1.2.2. Marcador de daño oxidativo: Niveles plasmáticos de malondialdehído.

Los resultados obtenidos con respecto a los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en mujeres de 30-49 años, y en mujeres postmenopáusicas de más de 49 años antes y después de la administración de NAC, se muestran en la tabla 31 y en la figura 76.

La comparación de los valores obtenidos en mujeres de 30-49 años y previos al tratamiento en mujeres de 50-69 años y mayores de 69, reveló un efecto general de la edad aumentando los niveles de MDA en plasma ($P<0,001$). Estas diferencias se observaron ya a partir de la década de los 50 y fueron más relevantes en la de los 70 ($P<0,001$), presentando éstas niveles plasmáticos de MDA significativamente mayores que los de las mujeres de 50-69 años ($P<0,01$).

La administración de NAC produjo una disminución de los niveles de MDA en plasma ya a los 2 meses de tratamiento en ambos grupos de edad estudiados ($P<0,001$), que se mantuvo con 4 meses de administración ($P<0,001$) e incluso 3 meses después de la finalización de la misma ($P<0,001$ en mujeres de 50-69 años, $P<0,01$ en las de más de 69).

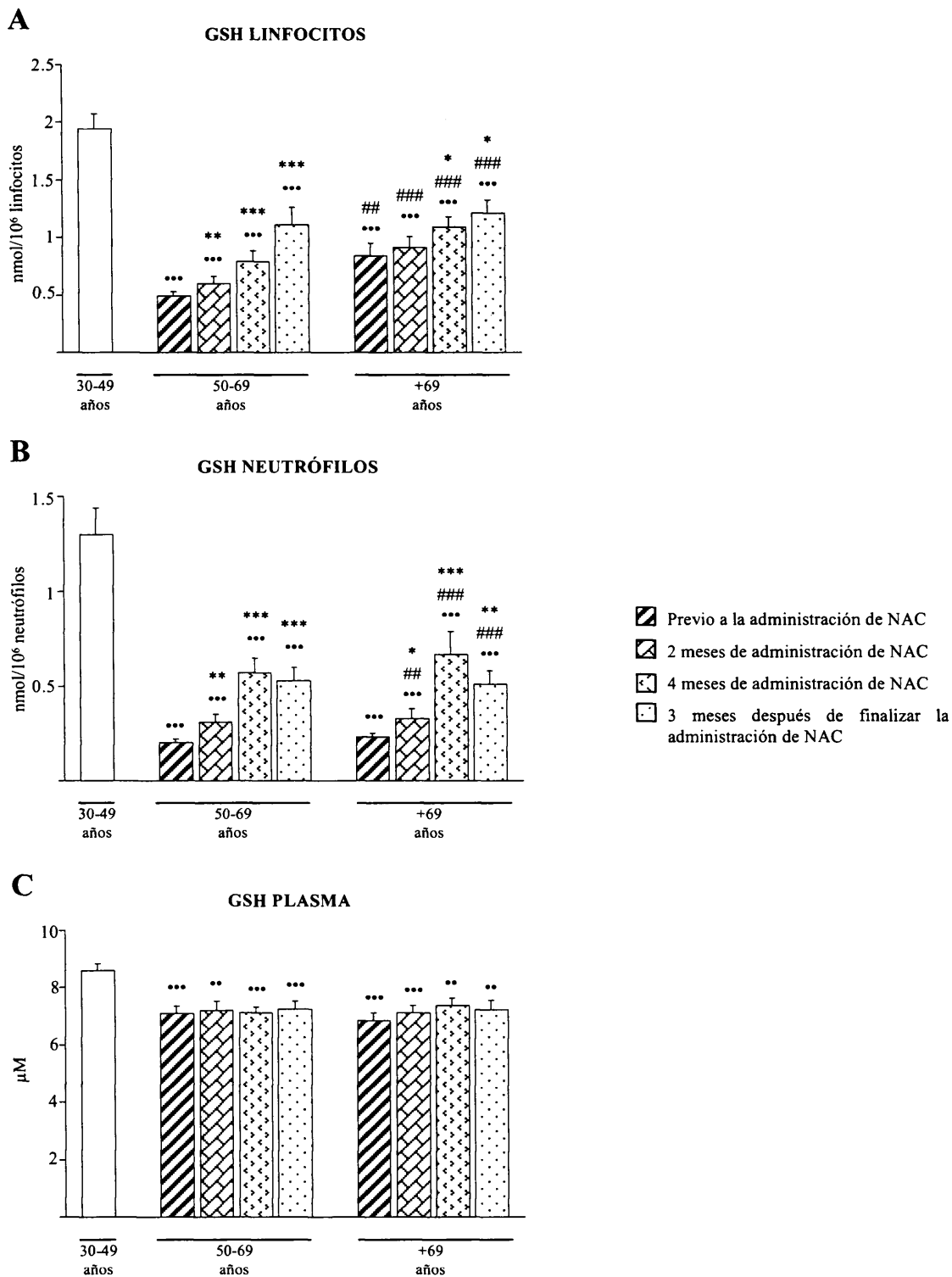


Figura 75. Valores de glutatión (GSH) en linfocitos (nmol/10⁶ linfocitos) (A), neutrófilos (nmol/10⁶ neutrófilos) (B) y plasma (μM) (C) de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor obtenido antes de iniciarse el tratamiento. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 30-49 años. ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 50-69 años.

De esta forma, los valores de MDA plasmático en mujeres postmenopáusicas de 50-69 años llegaron a igualar los de mujeres más jóvenes de 30-49 años gracias a la suplementación con el antioxidante y a lo largo de todo el estudio. Por otra parte, los niveles de MDA en plasma de las mujeres de más de 69 años disminuyeron al nivel de las de 30-49 tras 2 meses de administración oral de NAC, y se mantuvieron disminuidos al nivel de las de 50-69 con 4 meses de suplementación y 3 meses después de finalizar ésta.

Tabla 31. Valores de malondialdehído (MDA) plasmáticos (μM) de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización.

MDA (μM)	Previo NAC	2 meses NAC	4 meses NAC	3 meses tras NAC
30-49 años	2,24 \pm 0,07			
50-69 años	3,39 \pm 0,19	2,55 \pm 0,17	2,28 \pm 0,12	2,49 \pm 0,14
≥ 70 años	4,21 \pm 0,20	2,55 \pm 0,14	2,91 \pm 0,20	3,46 \pm 0,21

Se muestra la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos.

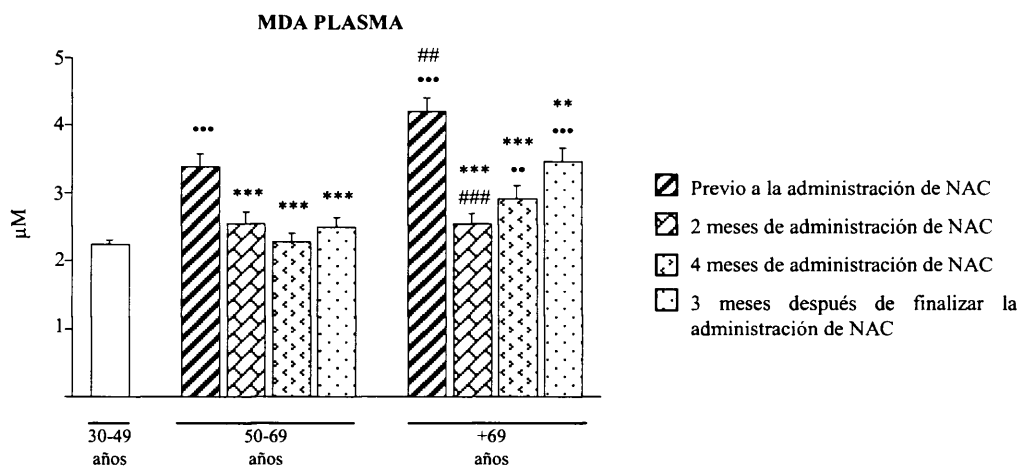


Figura 76. Valores de malondialdehído (MDA) plasmáticos (μM) de mujeres de 30-49 años (controles), y de mujeres postmenopáusicas de 50-69 años y de más de 69 años previo a la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 y 4 meses de haberse iniciado dicha administración, y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 16-18 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido antes de iniciarse el tratamiento. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 30-49 años. ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ con respecto al valor obtenido en las mujeres de 50-69 años.

4.2.2. Intervención psicológica: Ambiente enriquecido.

4.2.2.1. Efecto del ambiente enriquecido en el deterioro inmunitario, conductual y cognitivo asociado a la edad en ratones hembras ICR/CD1 adultos y viejos.

4.2.2.1.1. Estudio inmunológico en leucocitos peritoneales.

Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b, CD11c

La presencia de antígenos de diferenciación leucocitaria de membrana (CD) expresados por las principales células inmunitarias que pueden encontrarse en el peritoneo de ratones, esto es, CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b y CD11c, fue analizada por citometría de flujo en animales adultos maduros, viejos y muy viejos, controles y con enriquecimiento ambiental, cuyo efecto sobre los mismos fue discreto.

El porcentaje de linfocitos T **CD4** disminuyó globalmente en los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido ($P < 0,05$) (Tabla 32).

El enriquecimiento ambiental no produjo cambios en el porcentaje de linfocitos T **CD8**, si bien la edad conduce a un aumento del mismo ($P = 0,051$), mostrando globalmente los muy viejos una tendencia hacia mayores valores que los adultos ($P = 0,067$) (Tabla 32).

Con respecto a la cantidad relativa de células que expresan el receptor de IL-2 **CD25**, el ambiente enriquecido no condujo a cambios globales sobre este parámetro, y si bien se observó interacción entre esta condición y la edad de los individuos en que se aplica ($P < 0,05$), el análisis *posthoc* no reveló diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos comparados. Así, los viejos mostraron globalmente menores valores que los adultos ($P < 0,01$) (Tabla 32).

No hubo cambios destacados debidos al enriquecimiento en el porcentaje de células **CD19** (linfocitos B) presente en el peritoneo de los ratones (Tabla 32).

Tampoco varió la cantidad relativa de células que expresan **CD11b** (macrófagos) presente en el peritoneo en función del enriquecimiento, si bien se observó una tendencia hacia efecto general de la edad ($P = 0,056$), mostrando globalmente los viejos una tendencia hacia menores valores que los muy viejos ($P = 0,052$). El análisis *posthoc* reveló esta misma tendencia entre viejos control y muy viejos enriquecidos ($P = 0,094$) (Tabla 32).

Por último, el porcentaje de células dendríticas o **CD11c** no cambió en los animales enriquecidos, si bien existió efecto general de la edad ($P<0,05$), y así los viejos tuvieron globalmente menores valores que los adultos ($P<0,05$), y esa misma tendencia se observó en los muy viejos con respecto a éstos ($P=0,075$) (Tabla 32).

Tabla 32. Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD8, CD25, CD19, CD11b y CD11c (%) en leucocitos peritoneales murinos, procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
% CD4	6,29±2,75	2,63±0,67	4,22±0,88	3,09±0,81	8,37±1,92	2,12±0,44
% CD8	2,03±0,45	1,39±0,27	3,57±1,00	2,37±0,58	3,18±0,81	3,55±0,96
% CD25	11,05±2,98	20,99±4,04	6,01±2,32	6,33±1,12	28,44±9,84	8,67±2,09
% CD19	51,28±10,32	71,33±5,60	40,66±14,07	36,15±12,13	54,73±12,95	70,10±5,32
% CD11b	14,11±3,71	25,39±6,73	8,27±2,30	19,33±4,60	37,44±16,46	31,69±6,15
% CD11c	2,32±0,76	2,87±0,47	0,59±0,15	1,03±0,22	1,30±0,48	0,94±0,19

Se muestra la media \pm el error estándar de 5-10 valores (5-10 adultos maduros; 5-7 viejos; 4-7 muy viejos) correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Capacidad funcional de los leucocitos

- **Macrófagos: Quimiotaxis, fagocitosis y niveles de ROS intracelulares**

Los resultados relativos al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre la función de macrófagos peritoneales murinos se muestran en la tabla 33 y la figura 77.

Con respecto a la **capacidad quimiotáctica** de los macrófagos peritoneales (Tabla 33 y Fig. 77A), se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental aumentando ($P<0,001$) dicha función, que se ve disminuida con la edad ($P<0,001$).

No obstante, existió interacción entre el efecto de la condición de enriquecimiento y la edad de los sujetos ($P<0,001$). El análisis *posthoc* reveló que el aumento de la quimiotaxis de macrófagos consecuencia del enriquecimiento se produce en los animales adultos maduros ($P<0,001$), y también en los muy viejos ($P<0,001$), cuya función en controles se encuentra muy disminuida ($P<0,001$ con respecto a adultos y viejos), pero llega a igualar el valor de los adultos y superar el de los viejos ($P<0,05$) con el enriquecimiento.

El ambiente enriquecido no causó efecto alguno en la quimiotaxis de macrófagos procedentes de viejos, cuya función en controles muestra ya valores similares a los de los adultos.

Tabla 33. Función de macrófagos: Índice de quimiotaxis (número de macrófagos), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 macrófagos) y eficacia de fagocitosis (número de macrófagos fagocíticos/100 macrófagos) de macrófagos peritoneales murinos, y niveles de ROS intracelulares en presencia de PMA (% estímulo) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Función macrófagos	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
Índice quimiotaxis	498±25	809±20	471±24	553±20	308±13	588±22
Índice fagocitosis	624±24	692±29	417±36	647±18	307±28	577±13
Eficacia fagocitosis	82±2	81±2	66±2	77±3	56±3	77±2
Niveles ROS (%)	158±7	166±9	131±6	154±12	131±12	162±17

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Además, se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental aumentando la **capacidad fagocítica** de los macrófagos, representada tanto en forma de índice ($P<0,001$) (Tabla 33 y Fig. 77B) como de eficacia ($P<0,01$) (Tabla 33 y Fig. 77C), mientras que ambas se ven disminuidas con la edad ($P<0,001$).

De nuevo, existió interacción entre el efecto de la condición de enriquecimiento y la edad de los sujetos ($P<0,001$). El análisis *posthoc* reveló que la mejora más destacada ($P<0,001$) de la función fagocítica consecuencia del enriquecimiento se produce en los animales que mostraban unos valores más bajos, esto es, los muy viejos ($P<0,001$ con respecto a los adultos). Así, los muy viejos enriquecidos mostraron valores similares de eficacia e índice fagocítico que los adultos, y éste último por encima de los viejos ($P<0,05$).

En los viejos, el enriquecimiento aumentó ($P<0,01$) el índice de fagocitosis, que en controles se encontraba por debajo del de los adultos ($P<0,01$), hasta valores similares a ellos. El ambiente enriquecido en esta edad no tuvo efecto significativo sobre la eficacia fagocítica, que se encontraba menos disminuida ($P<0,01$ con respecto a los adultos) que el índice, pero sus valores también igualaron a los de los adultos.

Por último, los niveles de **ROS** en leucocitos peritoneales murinos (Tabla 33 y Fig. 77D), que tienden a disminuir con el envejecimiento, aumentaron de forma global gracias al enriquecimiento ambiental ($P<0,05$).

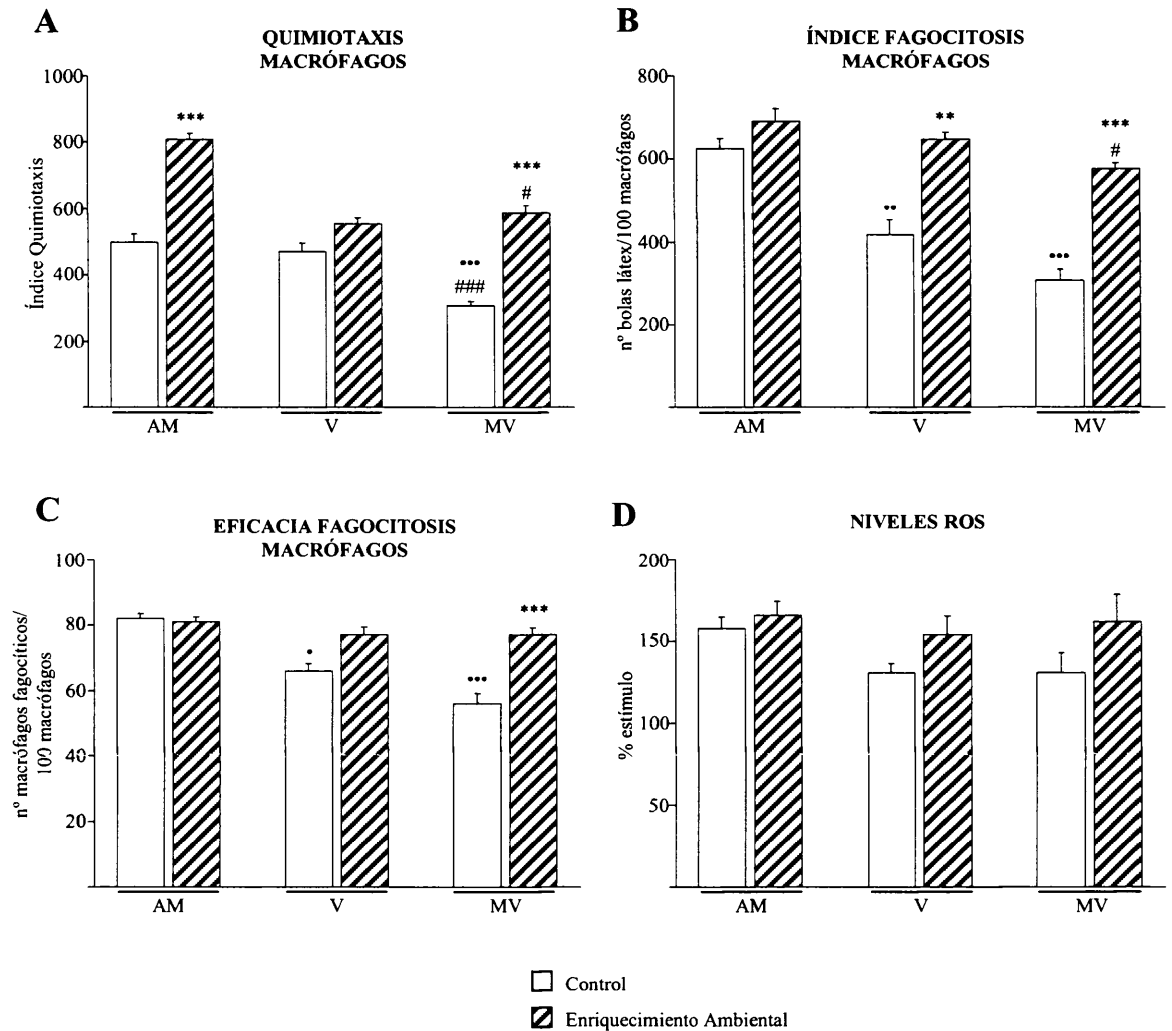


Figura 77. Índice de quimiotaxis (número de macrófagos) (A), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 macrófagos) (B) y eficacia de fagocitosis (número de macrófagos fagocíticos/100 macrófagos) (C) de macrófagos peritoneales murinos, y niveles de ROS intracelulares en presencia de PMA (% estímulo) (D) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

• **Linfocitos: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK**

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre la función de linfocitos peritoneales murinos se muestran en la tabla 34 y las figuras 78-80.

Tabla 34. Función de linfocitos: Índice de quimiotaxis (número de linfocitos), proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales murinos no estimulados (basal) y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), y actividad *Natural Killer* (NK, % lisis) de leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Función linfocitos	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
Índice quimiotaxis	791±39	897±45	319±24	443±17	493±35	715±41
Proliferación basal (cpm)	1267±129	2330±416	1071±28	1113±100	1383±271	1998±120
Proliferación LPS (cpm)	4581±100	6618±208	2809±217	1526±100	3131±91	6512±205
Proliferación ConA (cpm)	3111±136	3060±122	1872±92	2493±88	2847±33	3333±56
Actividad NK (% lisis)	47±2	53±2	39±4	49±3	35±3	50±3

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

En relación a la **capacidad quimiotáctica** de los linfocitos peritoneales (Tabla 34 y Fig. 78), se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental aumentando ($P<0,001$) dicha función, que se ve disminuida con la edad ($P<0,001$).

En viejos, el enriquecimiento aumentó la migración de los linfocitos hacia el foco infeccioso ($P<0,05$), pero los valores no llegaron al nivel de los mostrados por los adultos ($P<0,001$). En muy viejos, cuyos niveles funcionales en controles se encontraban por debajo de los de los adultos ($P<0,001$) pero por encima de los de los viejos ($P<0,05$), el ambiente enriquecido aumentó los valores ($P<0,05$) hasta niveles similares a aquéllos, muy por encima de éstos ($P<0,001$).

Con respecto a la **proliferación** de los linfocitos peritoneales (Tabla 34 y Fig. 79), el enriquecimiento ambiental la aumentó a nivel basal ($P<0,05$), mientras que tiende a disminuir con la edad ($P=0,053$). Este efecto del enriquecimiento se produjo fundamentalmente en adultos maduros ($P<0,05$) y en muy viejos, en los que se alcanzaron valores superiores a los de adultos maduros ($P<0,01$) y viejos ($P<0,001$) control.

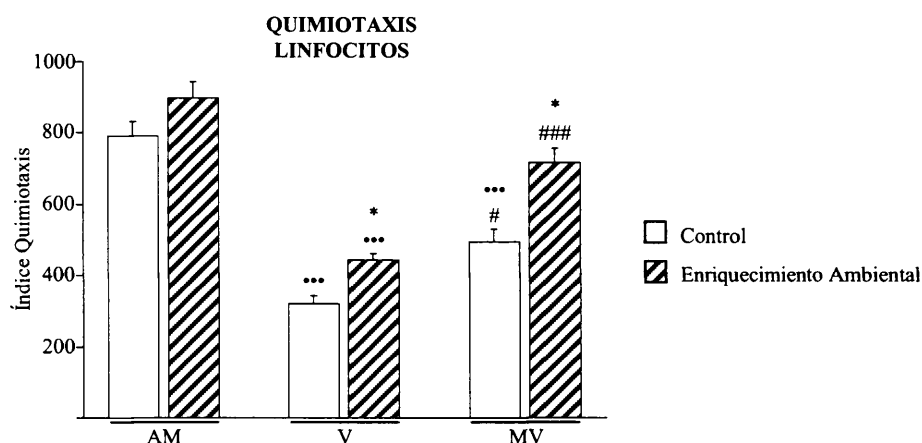


Figura 78. Índice de quimiotaxis de linfocitos peritoneales murinos (número de células) de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

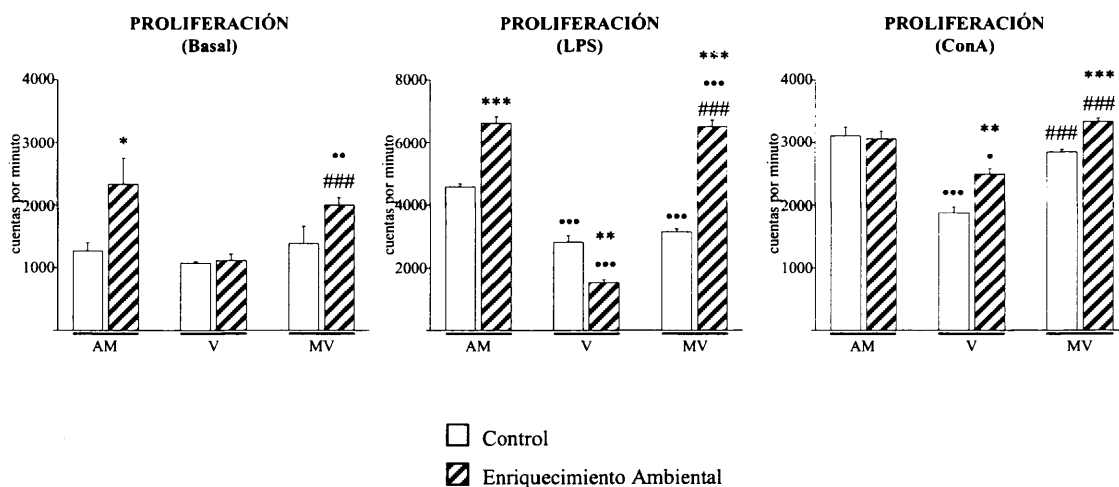


Figura 79. Proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales murinos no estimulados (basal) y estimulados con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA), procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. ### $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

El ambiente enriquecido aumentó muy significativamente ($P<0,001$) de manera global la respuesta proliferativa de los linfocitos ante el estímulo LPS (Tabla 34 y Fig. 79), que se ve disminuida con la edad ($P<0,001$). Sin embargo, de forma interesante, el efecto del enriquecimiento fue diferencial dependiendo de la edad de los sujetos ($P<0,001$). Así, el ambiente enriquecido aumentó la función en adultos maduros y en muy viejos ($P<0,001$), pero la disminuyó en los viejos ($P<0,01$). En muy viejos, cuyos controles mostraban niveles funcionales similares a los viejos y muy por debajo de los adultos ($P<0,001$), el enriquecimiento aumentó los valores por encima de ambos ($P<0,001$ con respecto a adultos y viejos control).

También, el ambiente enriquecido aumentó muy significativamente ($P<0,001$) de manera global la respuesta proliferativa de los linfocitos ante el mitógeno ConA (Tabla 34 y Fig. 79), que disminuye con la edad ($P<0,001$). Nuevamente, el efecto del enriquecimiento dependió de la edad de los sujetos ($P<0,05$), de forma que sólo existió aumento de función en viejos y muy viejos ($P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente). Los valores en viejos, que en controles se encontraban muy por debajo de los mostrados por los adultos ($P<0,001$), se aproximaron a ellos como consecuencia del ambiente enriquecido ($P<0,05$).

Por último, la **actividad NK** de los leucocitos peritoneales murinos (Tabla 34 y Fig. 80) aumentó globalmente gracias al enriquecimiento ambiental ($P<0,001$), mientras que se ve disminuida con la edad ($P<0,01$). El análisis estadístico más profundo reveló que la disminución de esta función con la edad se produce fundamentalmente en muy viejos ($P<0,05$), y que son éstos los más beneficiados por el ambiente enriquecido ($P<0,01$), llegando a alcanzar los niveles funcionales mostrados por los adultos.

- **Niveles de interleuquina 2**

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre los niveles de interleuquina 2 (IL-2) en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales murinos estimulados con concanavalina A se muestran en la figura 81. El ambiente enriquecido aumentó significativamente dichos niveles ($P<0,01$), mientras que el envejecimiento los disminuye ($P<0,001$).

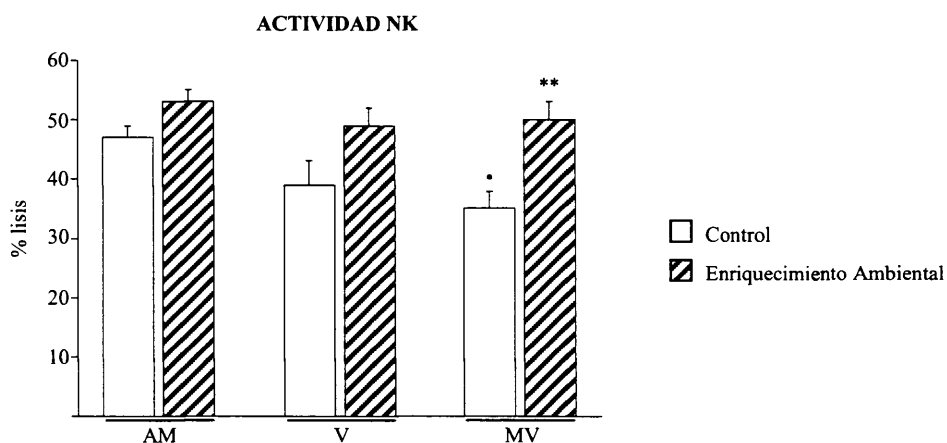


Figura 80. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido.

El enriquecimiento tuvo un efecto claramente diferencial con dependencia de la edad de los sujetos en que fue aplicado ($P < 0,001$). El análisis estadístico más detallado reveló ausencia de cambios en los adultos maduros enriquecidos con respecto al grupo control. El ambiente enriquecido tampoco tuvo efecto sobre los niveles de esta citoquina en viejos, mostrando ambos grupos, control y enriquecido, valores similares y muy por debajo de los obtenidos en animales jóvenes ($P < 0,001$). No obstante, los muy viejos sí se vieron beneficiados por el enriquecimiento. Así, mientras que los muy viejos control tuvieron valores similares a los de viejos y mucho menores que los de adultos ($P < 0,001$), los muy viejos enriquecidos alcanzaron los niveles de esta citoquina observados en adultos, siendo éstos significativamente mayores que los encontrados en viejos y muy viejos control ($P < 0,001$) (Fig. 81).

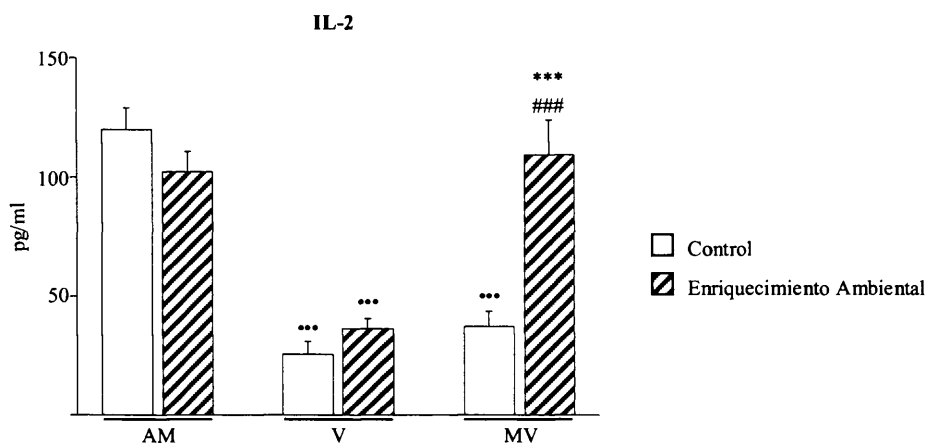


Figura 81. Niveles de IL-2 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, de leucocitos peritoneales murinos procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($120,00 \pm 9,15$, $25,52 \pm 5,55$ y $37,49 \pm 6,33$ pg/ml, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($102,49 \pm 8,41$, $36,31 \pm 4,37$ y $109,31 \pm 14,77$ pg/ml, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; ** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; ### $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

Estrés oxidativo e inflamatorio en los leucocitos

Marcadores de oxidación e inflamación

- **Niveles de glutatión oxidado**

Se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental disminuyendo el contenido en glutatión oxidado (GSSG) intracelular de leucocitos peritoneales murinos ($P < 0,001$), que se ve aumentado al envejecer ($P < 0,001$) (Fig. 82). Se vio también una tendencia hacia efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los individuos en que se aplica ($P = 0,053$). Así, la disminución más destacada se produjo en adultos maduros ($P < 0,001$) y en viejos ($P < 0,05$), cuyos niveles en controles se encontraban por encima de los de animales más jóvenes ($P < 0,05$), pero alcanzaron valores similares a los mismos gracias al ambiente enriquecido.

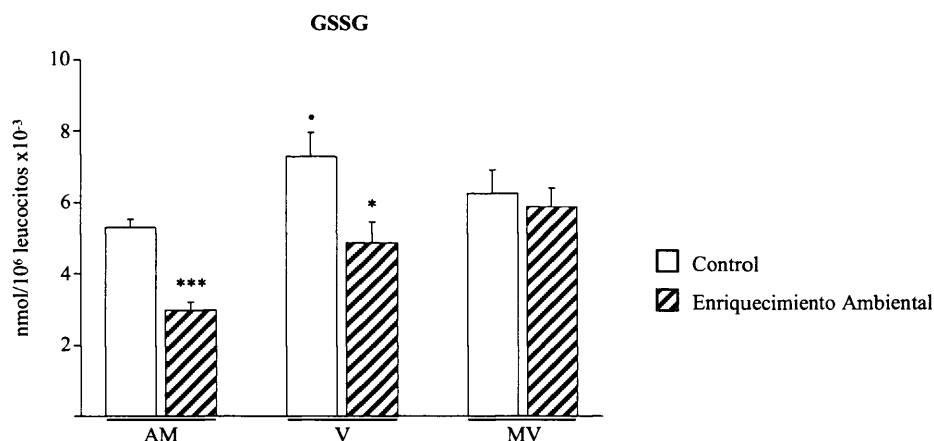


Figura 82. Valores de glutatión oxidado (GSSG) (nmol/10⁶ leucocitos x10⁻³) en leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles (5,30±0,22, 7,27±0,68 y 6,24±0,66 nmol/10⁶ leucocitos x10⁻³, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental (2,96±0,24, 4,87±0,56 y 5,86±0,55 nmol/10⁶ leucocitos x10⁻³, respectivamente). Cada columna representa la media ± el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ****P*<0,001, **P*<0,05 con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; •*P*<0,05 con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido.

• *Actividad xantina oxidasa*

Se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental disminuyendo la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO) en leucocitos peritoneales murinos (*P*<0,05), que por otra parte se ve aumentada con el envejecimiento (*P*<0,05) (Fig. 83). Existió un efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los individuos en que se aplica (*P*<0,001). Así, la disminución más notable se produjo en viejos (*P*<0,001), cuyos valores en controles se encontraban por encima de los de adultos (*P*<0,01), pero llegaron a ser similares a los mismos gracias al ambiente enriquecido.

• *Expresión de membrana de receptores Toll 2 y 4*

Se observó una tendencia hacia efecto general del enriquecimiento ambiental disminuyendo la cantidad relativa de linfocitos T **CD4 que expresan el receptor Toll 2** (TLR2) dentro de la población total de linfocitos T CD4 peritoneal (*P*=0,091). No obstante, existió un efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los individuos en que se aplica (*P*<0,05). Así, esta disminución se produjo únicamente en muy viejos (*P*<0,05), cuyos valores en controles se encontraban por encima de los de adultos y viejos (*P*<0,05), pero llegaron a ser similares a los mismos gracias al ambiente enriquecido (Fig. 84A).

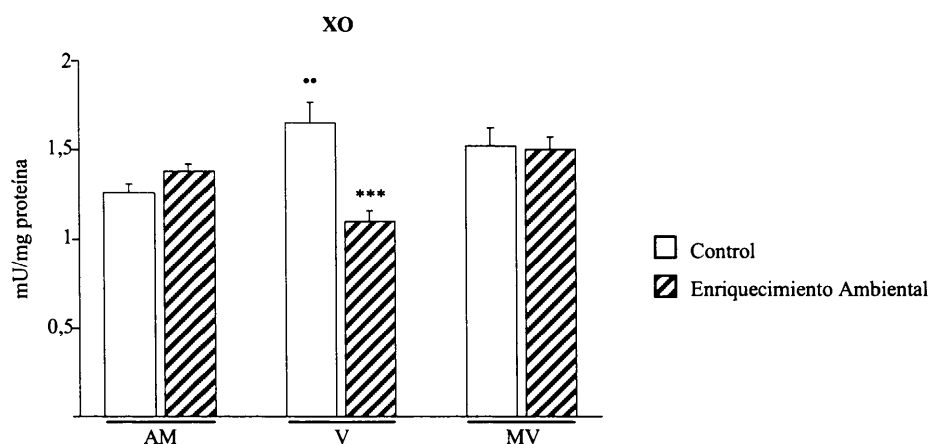


Figura 83. Actividad xantina oxidasa (XO) (mU/mg proteína) en leucocitos peritoneales murinos de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($1,26 \pm 0,05$, $1,65 \pm 0,12$ y $1,52 \pm 0,10$ mU/mg proteína, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($1,38 \pm 0,04$, $1,10 \pm 0,06$ y $1,50 \pm 0,07$ mU/mg proteína, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido.

Un patrón similar se observó para el porcentaje de células T **CD8 que expresan este mismo receptor**, que disminuyó en muy viejos enriquecidos con respecto a sus controles de edad ($P < 0,01$), mientras que los valores de éstos se encontraban por encima de adultos ($P = 0,068$) y viejos ($P < 0,05$). Así, el porcentaje de células T CD8⁺-TLR2⁺ en animales muy viejos igualó al de edades más jóvenes gracias al ambiente enriquecido (Fig 84B).

Se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental altamente significativo disminuyendo la cantidad relativa de linfocitos T **CD4 que expresan el receptor Toll 4 (TLR4)** dentro de la población total de linfocitos T CD4 peritoneal ($P < 0,001$). Existió efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los individuos en que se aplica ($P < 0,05$). Así, esta disminución se produjo únicamente en muy viejos ($P < 0,001$), cuyos valores en controles se encontraban por encima de los de los adultos ($P < 0,01$) y los viejos ($P < 0,05$), pero llegaron a ser similares a los mismos gracias al ambiente enriquecido (Fig. 85A).

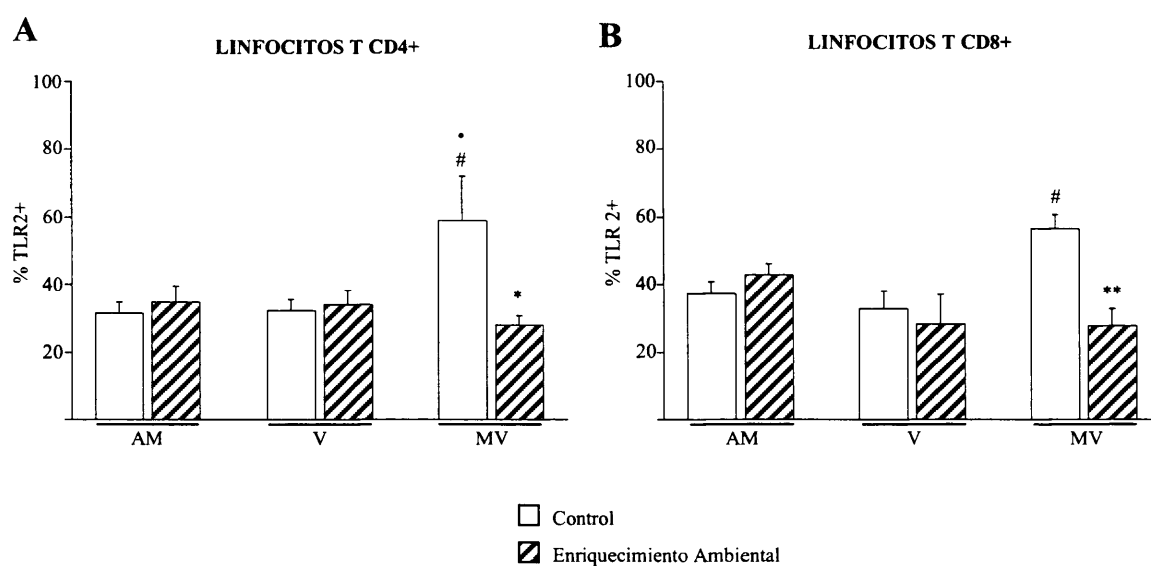


Figura 84. Porcentaje de células CD4 y CD8 que expresan el receptor Toll 2 de membrana (% TLR2+) en la población total de células CD4 (A) y CD8 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles (31,47±3,41, 32,34±3,10 y 59,06±12,87 % CD4+-TLR2+, y 37,20±3,65, 32,70±5,37 y 56,36±4,34 % CD8+-TLR2+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental (34,85±4,64, 33,94±4,25 y 27,89±2,93 % CD4+-TLR2+, y 42,71±3,39, 28,18±8,85 y 27,70±5,02 % CD8+-TLR2+, respectivamente). Cada columna representa la media ± el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7-10 adultos maduros; 6-7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

También se observó un efecto general del enriquecimiento ambiental disminuyendo la cantidad relativa de linfocitos T **CD8 que expresan el TLR4** dentro de la población total de linfocitos T CD8 peritoneal ($P < 0,05$). Este efecto fue especialmente marcado en el caso de los viejos enriquecidos, que disminuyeron sus valores por debajo de los encontrados en los adultos control ($P < 0,05$) (Fig. 85B).

En cuanto a la cantidad relativa de **células que expresan el receptor de IL-2 CD25 positivas para el TLR2**, si bien existió un efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los individuos ($P < 0,05$), el análisis *posthoc* no reveló diferencias significativas entre ninguno de los grupos comparados (Fig. 86A).

Un patrón similar se observó para el porcentaje de células B **CD19 que expresan este mismo receptor** (Fig 86B). También en este caso el enriquecimiento tuvo un efecto diferencial con dependencia de la edad de los sujetos ($P < 0,05$), de modo que los muy viejos enriquecidos vieron aumentados sus valores por encima de los observados en los adultos control ($P < 0,01$).

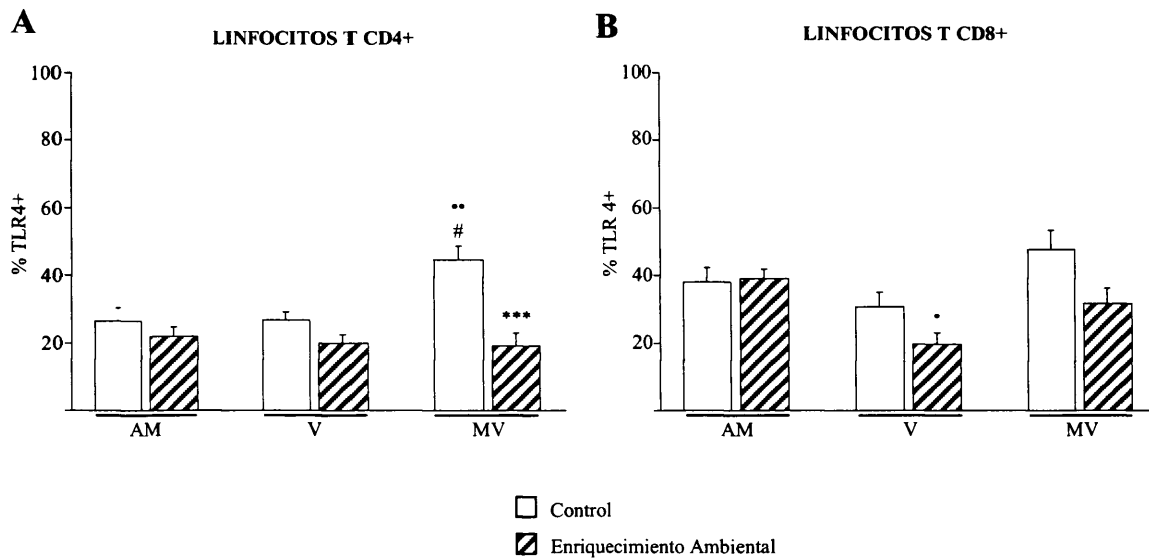


Figura 85. Porcentaje de células CD4 y CD8 que expresan el receptor Toll 4 de membrana (% TLR4+) en la población total de células CD4 (A) y CD8 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($26,41 \pm 4,15$, $26,70 \pm 2,45$ y $44,59 \pm 4,11$ % CD4+-TLR4+, y $37,99 \pm 4,24$, $30,85 \pm 4,17$ y $47,49 \pm 5,81$ % CD8+-TLR4+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($22,00 \pm 2,59$, $19,97 \pm 2,42$ y $19,11 \pm 3,90$ % CD4+-TLR4+, y $39,03 \pm 2,71$, $19,66 \pm 3,31$ y $31,85 \pm 4,49$ % CD8+-TLR4+, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7-10 adultos maduros; 6-7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

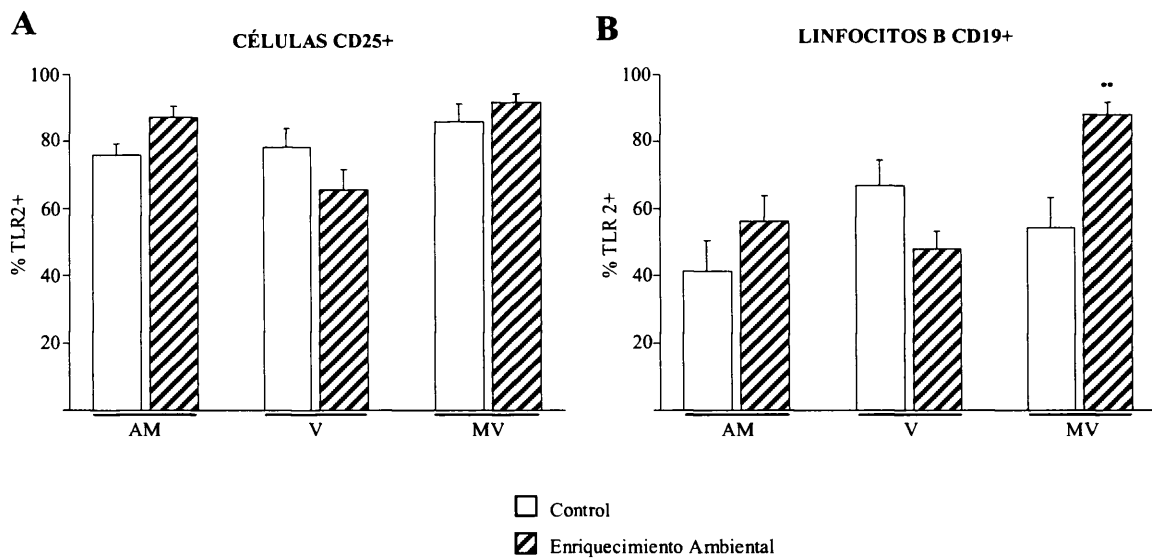


Figura 86. Porcentaje de células CD25 y CD19 que expresan el receptor Toll 2 de membrana (% TLR2+) en la población total de células CD25 (A) y CD19 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($75,88 \pm 3,44$, $78,33 \pm 5,43$ y $85,78 \pm 5,47$ % CD25+-TLR2+, y $41,38 \pm 8,98$, $66,83 \pm 7,54$ y $54,14 \pm 9,02$ % CD19+-TLR2+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($87,18 \pm 3,32$, $65,61 \pm 5,92$ y $91,66 \pm 2,46$ % CD25+-TLR2+, y $56,07 \pm 7,58$, $47,95 \pm 5,16$ y $87,83 \pm 3,86$ % CD19+-TLR2+, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (7-9 adultos maduros; 5-6 viejos; 4-6 muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido.

No se observaron diferencias significativas con respecto a la cantidad relativa de células **CD25** o **B CD19** que expresan el **TLR4**, ni en función de la edad ni del enriquecimiento ambiental (Fig. 87A,B).

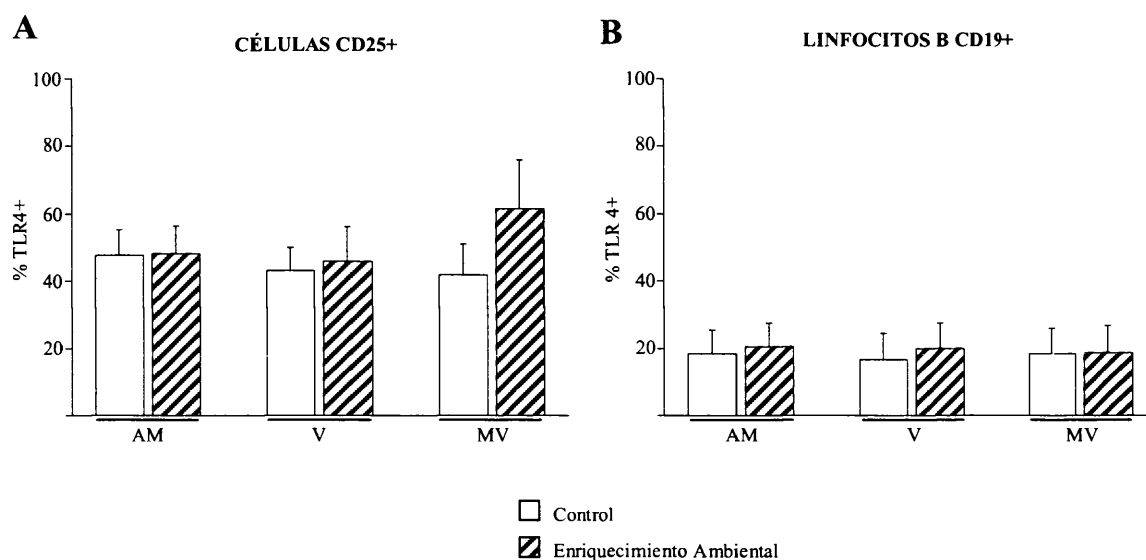


Figura 87. Porcentaje de células CD25 y CD19 que expresan el receptor Toll 4 de membrana (% TLR4+) en la población total de células CD25 (A) y CD19 (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($47,61 \pm 7,58$, $43,03 \pm 6,82$ y $41,86 \pm 9,07$ % CD25+-TLR4+, y $18,32 \pm 7,02$, $16,72 \pm 7,63$ y $18,50 \pm 7,45$ % CD19+-TLR4+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($48,04 \pm 8,47$, $45,72 \pm 10,57$ y $61,56 \pm 14,23$ % CD25+-TLR4+, y $20,29 \pm 7,28$, $19,87 \pm 7,63$ y $18,73 \pm 8,09$ % CD19+-TLR4+, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-9 adultos maduros; 5 viejos; 4-6 muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

El enriquecimiento no tuvo ningún efecto sobre la cantidad relativa de **macrófagos que expresan el TLR2** dentro de la población total de macrófagos peritoneales. De este modo, tanto los muy viejos control ($P < 0,05$) como los enriquecidos ($P < 0,01$) presentaron mayores porcentajes de células CD11b+-TLR2+ con respecto a los adultos control (Fig. 88A).

En el caso de la expresión de **este mismo receptor en las células dendríticas**, el ambiente enriquecido produjo un efecto diferencial con dependencia de la edad de los individuos en que se aplica ($P < 0,001$), de modo que el porcentaje relativo de células CD11c+-TLR2+ disminuyó sólo en muy viejos enriquecidos en relación a sus controles de edad ($P < 0,05$), cuyos valores se encontraban por encima de los de los viejos ($P < 0,01$) (Fig. 88B).

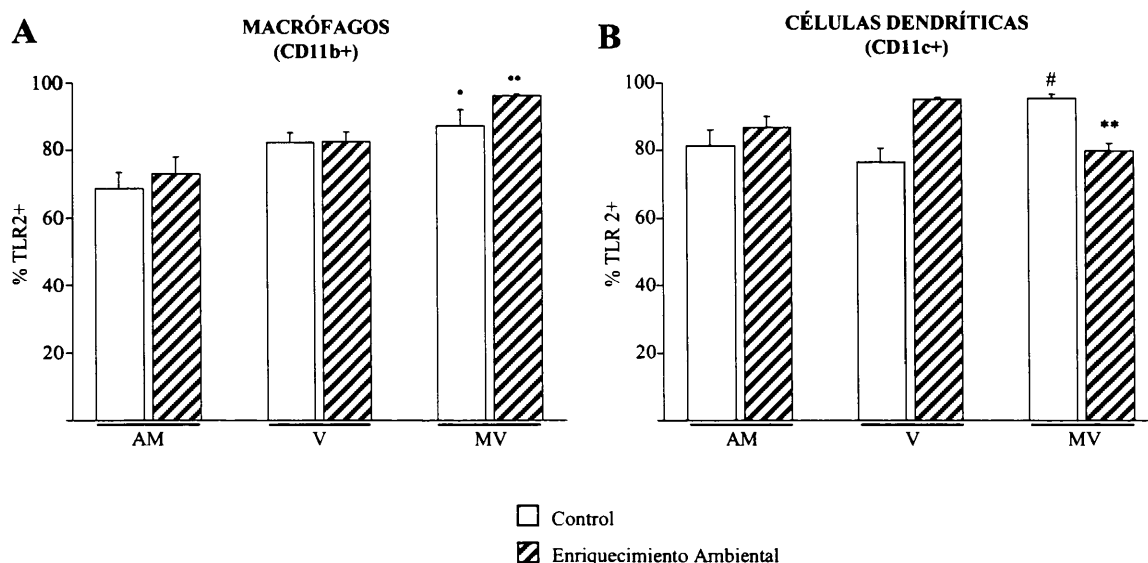


Figura 88. Porcentaje de células CD11b y CD11c que expresan el receptor Toll 2 de membrana (% TLR2+) en la población total de células CD11b (A) y CD11c (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles ($68,64 \pm 4,96$, $82,40 \pm 2,96$ y $87,45 \pm 4,86$ % CD11b+-TLR2+, y $81,28 \pm 4,80$, $76,68 \pm 3,99$ y $95,44 \pm 1,22$ % CD11c+-TLR2+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental ($73,02 \pm 5,08$, $82,70 \pm 3,04$ y $96,22 \pm 0,51$ % CD11b+-TLR2+, y $86,84 \pm 3,45$, $95,15 \pm 0,64$ y $79,88 \pm 2,21$ % CD11c+-TLR2+, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (5-10 adultos maduros; 5 viejos; 4-7 muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P < 0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; • $P < 0,01$, • $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

El enriquecimiento tuvo un efecto diferencial, dependiendo de la edad de los sujetos ($P < 0,05$), sobre la cantidad relativa de **macrófagos que expresan el TLR4** dentro de la población total de macrófagos peritoneal, de forma que el análisis *posthoc* reveló mayores porcentajes de células CD11b+-TLR2+ en los muy viejos enriquecidos con respecto a los adultos ($P < 0,001$) y los viejos ($P < 0,05$) control (Fig. 89A).

En el caso de la expresión de **este mismo receptor** en las membranas de **las células dendríticas**, de nuevo el ambiente enriquecido produjo un efecto diferencial con dependencia de la edad de los individuos en que se aplica ($P < 0,001$), de modo que el porcentaje relativo de células CD11c+-TLR4+ disminuyó sólo en muy viejos enriquecidos en relación a sus controles de edad ($P < 0,05$) (Fig. 89B).

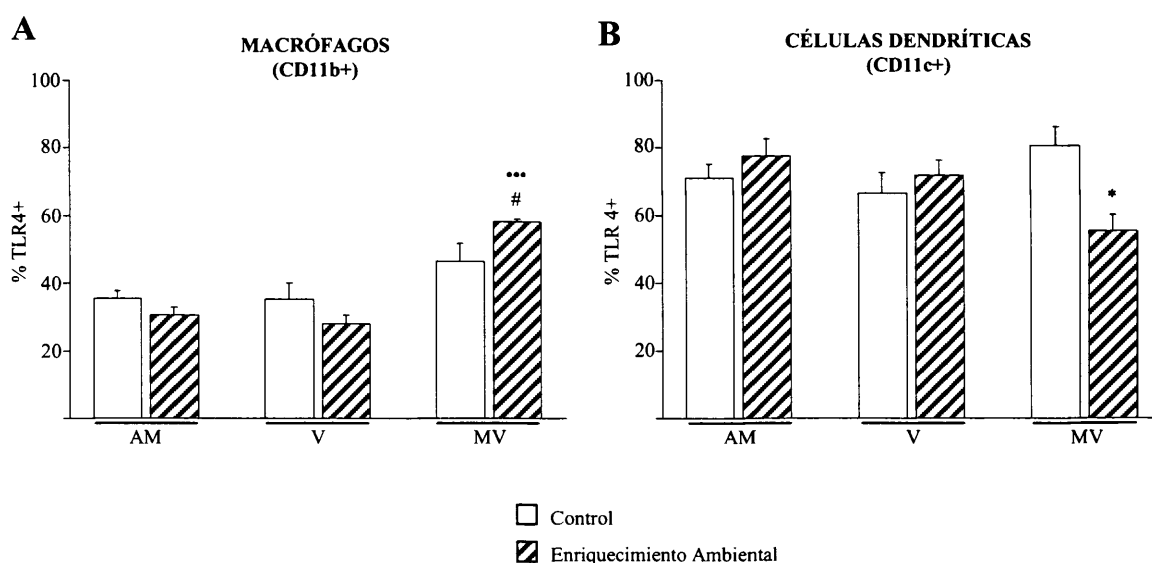


Figura 89. Porcentaje de células CD11b y CD11c que expresan el receptor Toll 4 de membrana (% TLR4+) en la población total de células CD11b (A) y CD11c (B), respectivamente, del peritoneo de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles (35,50±2,30, 35,35±4,59 y 46,45±5,14 % CD11b+-TLR4+, y 71,01±4,12, 66,42±6,19 y 80,65±5,58 % CD11c+-TLR4+, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental (30,50±2,27, 28,00±2,38 y 58,12±0,91 % CD11b+-TLR4+, y 77,59±5,10, 71,72±4,63 y 55,44±4,69 % CD11c+-TLR4+, respectivamente). Cada columna representa la media ± el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (5-10 adultos maduros; 5 viejos; 5-6 muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; *** $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

• Niveles de factor de necrosis tumoral α

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre los niveles de TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales murinos estimulados con LPS se muestran en la figura 90.

El ambiente enriquecido aumentó significativamente dichos niveles ($P < 0,05$), mientras que el envejecimiento tiende globalmente a disminuirlos ($P = 0,070$). Además, el enriquecimiento tuvo un efecto claramente diferencial con dependencia de la edad de los sujetos en que fue aplicado ($P < 0,001$). El análisis estadístico más detallado reveló que tal disminución se da únicamente en viejos ($P < 0,001$ con respecto a los adultos), y es en esa edad en la que el enriquecimiento produjo un efecto más destacado, aumentando ($P < 0,01$) los niveles de TNF- α hasta valores similares a los mostrados por animales más jóvenes.

En muy viejos, cuyos valores eran similares a los de los adultos maduros y muy superiores a los de los viejos ($P < 0,001$), el ambiente enriquecido no tuvo efecto sobre los

niveles de TNF- α , con lo que sus valores siguieron siendo mucho mayores ($P<0,01$) que los mostrados por los viejos control e idénticos a los de los adultos.

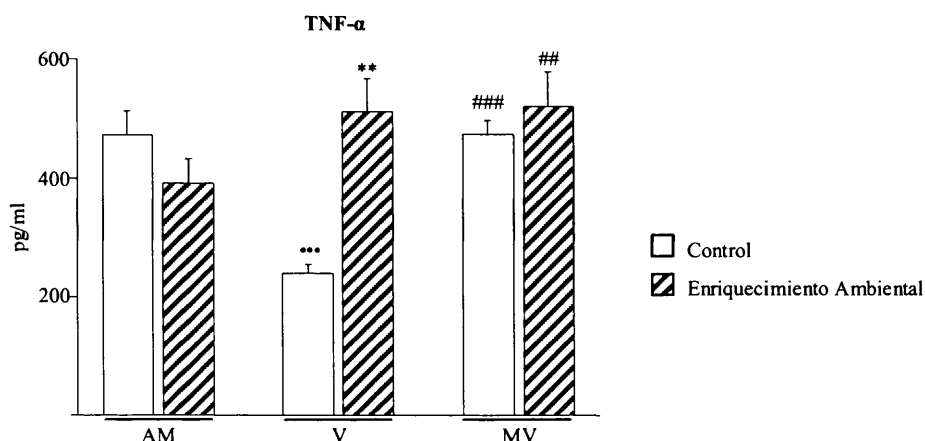


Figura 90. Niveles de TNF- α (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de leucocitos peritoneales murinos procedentes de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles (472 ± 41 , 240 ± 15 y 474 ± 23 pg/ml, respectivamente) y con enriquecimiento ambiental (392 ± 40 , 512 ± 55 y 520 ± 58 pg/ml, respectivamente). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ** $P<0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; *** $P<0,001$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido; ### $P<0,001$, ## $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

Defensas antioxidantes: Niveles de glutathion total, y actividades glutathion peroxidasa y catalasa

Los resultados obtenidos en relación al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre el contenido intracelular de glutathion total (GSH), y sobre las actividades de las enzimas antioxidantes glutathion peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), en leucocitos peritoneales murinos se muestran en la tabla 35 y la figura 91.

Tabla 35. Antioxidantes: Valores de glutathion (GSH, nmol/ 10^6 leucocitos), actividad glutathion peroxidasa (GPx, mU/ 10^6 leucocitos) (B) y actividad catalasa (CAT, U/ 10^6 leucocitos) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Antioxidantes	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
GSH (nmol/ 10^6 leucocitos)	1,06 \pm 0,02	1,02 \pm 0,05	0,73 \pm 0,03	0,99 \pm 0,09	1,08 \pm 0,11	1,24 \pm 0,12
GPx (mU/ 10^6 leucocitos)	446,50 \pm 20,90	441,07 \pm 17,64	225,00 \pm 33,62	487,71 \pm 43,40	312,43 \pm 21,22	379,71 \pm 34,33
CAT (U/ 10^6 leucocitos)	27,14 \pm 1,47	31,57 \pm 1,96	23,29 \pm 1,54	46,86 \pm 2,77	17,86 \pm 1,30	34,57 \pm 3,32

Se muestra la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

El ambiente enriquecido aumentó ($P<0,05$) de forma global los niveles de **GSH** (Tabla 35 y Fig. 91A), que por otra parte se ven disminuidos con la edad ($P<0,001$). Se observó además tendencia hacia un efecto diferencial del enriquecimiento dependiendo de la edad de los sujetos ($P=0,066$). De este modo, en viejos, cuyos controles mostraban niveles muy disminuidos de GSH con respecto a los adultos ($P<0,001$), los valores aumentaron hasta niveles similares a los mismos gracias al enriquecimiento. Asimismo, los muy viejos enriquecidos superaron el contenido intracelular de GSH en leucocitos de los viejos ($P<0,05$).

Ambas actividades antioxidantes estudiadas (Tabla 35 y Fig. 91A,B), **GPx** y **CAT**, aumentaron de manera general con el enriquecimiento ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente), mientras que disminuyen al envejecer ($P<0,001$). Se observó además un efecto diferencial del ambiente enriquecido dependiendo de la edad de los sujetos sobre los que se aplica ($P<0,001$).

Así, la actividad GPx aumentó fundamentalmente en los viejos enriquecidos ($P<0,001$), cuyos controles mostraban niveles muy disminuidos con respecto a los adultos ($P<0,001$), hasta niveles similares a ellos. En los muy viejos, en los que la actividad GPx se encontraba disminuida en relación a los adultos ($P<0,01$) y similar a los viejos, el enriquecimiento la aumentó hasta valores similares a aquéllos, superiores a éstos ($P<0,01$).

Por su parte, la actividad CAT aumentó de manera destacada en los viejos y muy viejos enriquecidos ($P<0,001$). Los viejos, que partían de valores de actividad CAT similares a los de los adultos, los superaron gracias al ambiente enriquecido ($P<0,001$). Los muy viejos, que en controles tenían valores de actividad enzimática menores que los de los adultos ($P<0,05$) y similares a los de viejos, igualaron los de aquéllos y superaron los de éstos ($P<0,05$), como consecuencia del enriquecimiento.

Apoptosis

No se observó efecto del enriquecimiento en el estímulo de la apoptosis de leucocitos peritoneales murinos en presencia de H_2O_2 . De esta forma, se encontraron valores similares en adultos, viejos y muy viejos controles (96 ± 2 , 101 ± 1 y 101 ± 2 %, respectivamente) y enriquecidos (97 ± 2 , 100 ± 2 y 101 ± 2 , respectivamente).

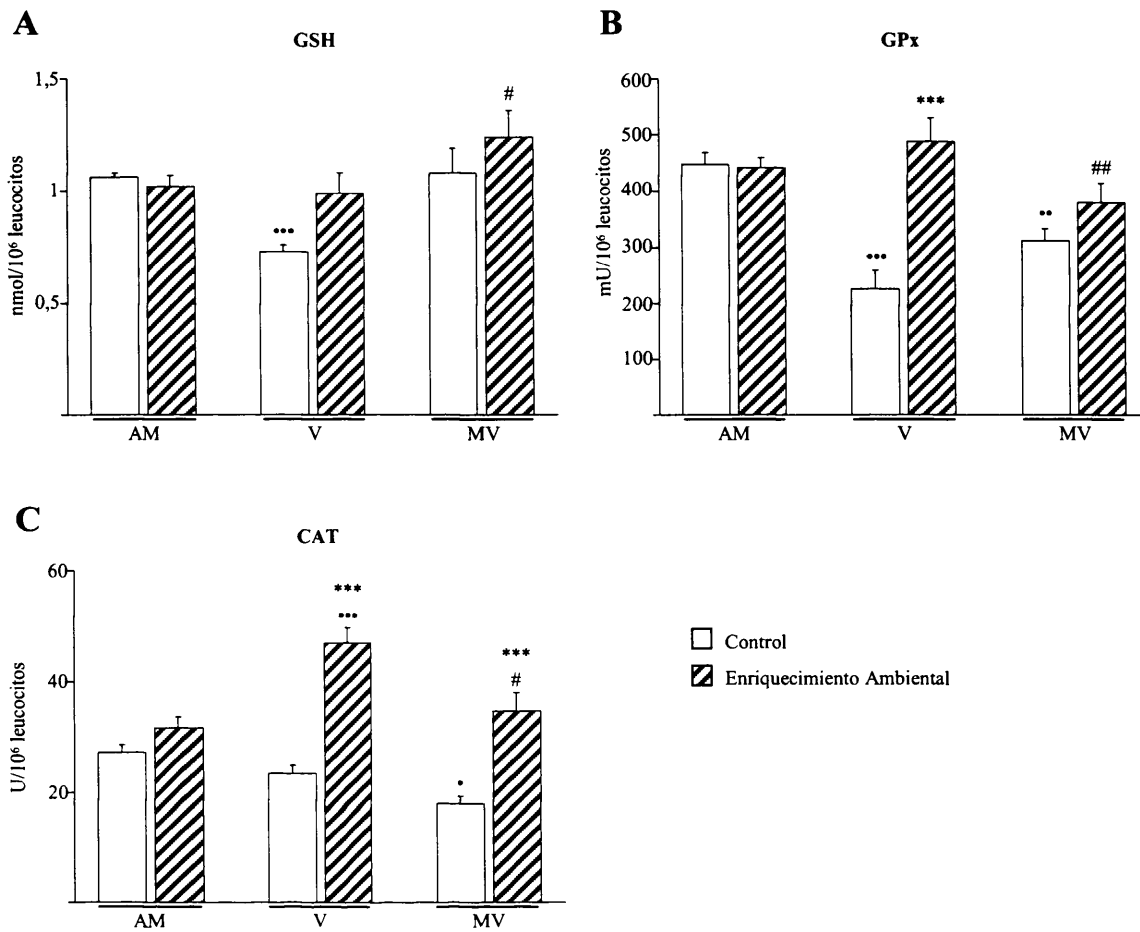


Figura 91. Valores de glutatión (GSH) (nmol/10⁶ leucocitos) (A), actividad glutatión peroxidasa (GPx) (mU/10⁶ leucocitos) (B) y actividad Catalasa (CAT) (U/10⁶ leucocitos) (C) en leucocitos peritoneales murinos, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 7-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14 adultos maduros; 7 viejos y muy viejos) y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; ** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido.

4.2.2.1.2. Estudio neurológico.

Los animales fueron sometidos a estudios de neuroimagen por resonancia magnética y se cuantificó la intensidad de la señal ponderada en T2 (tiempo que tarda la magnetización transversal en descender en un 63% de su fuerza máxima o, lo que es igual, persiste un 37%) en corteza cingular, amígdala, hipocampo, corteza entorrinal, corteza somatosensorial, y corteza motora. Los resultados se muestran en la tabla 36 y la figura 92. De manera general, los animales que habían vivido en el ambiente enriquecido mostraron

una tendencia hacia mayores valores de T2 que los controles, fundamentalmente en la corteza somatosensorial ($P=0,062$) y en el hipocampo (corte1, $P=0,063$). En la corteza entorrinal se observó una tendencia a la interacción entre el efecto del ambiente enriquecido y la edad de los sujetos sobre los que se aplica ($P=0,053$).

Tabla 36. Intensidad de la señal ponderada en T2 (ms) en distintas regiones cerebrales de ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos, y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

T2 (ms)	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
CC	66,18±1,70	68,72±1,68	64,69±2,12	66,63±0,32	65,48±0,97	69,60±1,83
Amg	72,61±1,55	71,38±2,00	75,78±1,69	68,44±1,61	72,33±1,76	70,02±5,41
HipC1	63,82±1,22	67,36±1,87	67,80±1,71	67,71±3,10	61,07±2,66	68,30±1,50
HipC2	64,74±1,43	67,64±3,24	70,10±1,65	71,91±3,02	67,27±1,39	72,24±1,76
HipC3	67,03±1,09	68,70±1,71	67,79±1,76	65,97±1,97	69,19±0,83	70,46±3,96
Cetr	69,14±2,03	72,81±1,81	76,99±1,30	70,26±2,22	65,51±1,22	78,05±3,41
CSS	67,09±1,08	68,35±2,19	65,52±2,06	65,71±1,73	65,63±0,76	74,79±1,32
CM	68,12±1,13	70,24±1,90	67,64±2,69	68,14±1,07	68,23±0,97	73,78±2,07

Se muestra la media \pm el error estándar de 4-16 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (14-16 adultos; 5 viejos; 4-5 muy viejos). Los muy viejos control mostraron valores significativamente menores ($P<0,01$) de T2 que los viejos control en CEtr, mientras éstos fueron similares a los encontrados en los muy viejos enriquecidos. También, los muy viejos enriquecidos tendieron hacia mayores valores de T2 que los adultos maduros control en CSS ($P=0,098$). CC = corteza cingular; Amg = amígdala; HipC1, 2, 3 = hipocampo corte 1, 2, 3; CEtr = corteza entorrinal; CSS = corteza somatosensorial; CM = corteza motora.

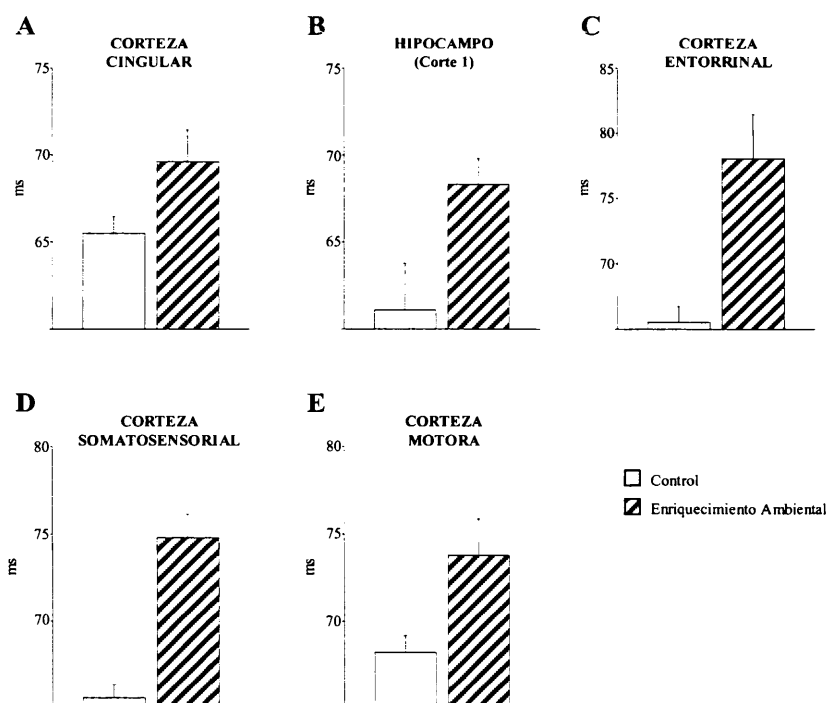


Figura 92. Intensidad de la señal ponderada en T2 (ms) en distintas regiones cerebrales de ratones hembras ICR/CD1 muy viejos controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 4-5 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos. Se observa la tendencia hacia mayores valores de T2 en los animales enriquecidos con respecto a los controles.

Además, en general, las áreas hiperintensas, que se corresponden con líquido cefalorraquídeo y representan atrofia cerebral, fueron menos pronunciadas en los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido que en los controles (Fig. 93).

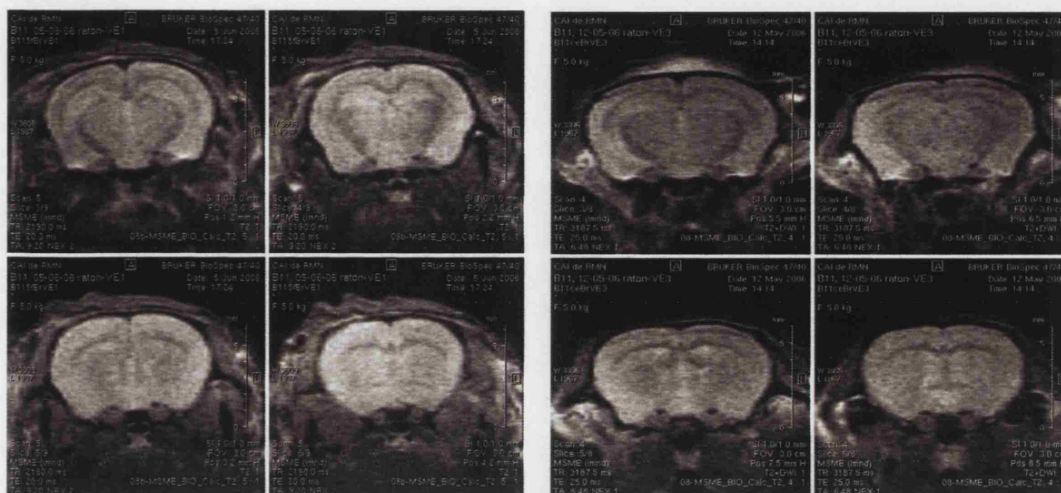


Figura 93. Imágenes coronales ponderadas en T2 con supresión de grasa para 4 cortes contiguos de cerebro de 2 ratones hembras ICR/CD1 muy viejos enriquecidos. Las áreas brillantes de alta señal se corresponden con líquido cefalorraquídeo y son representativas de atrofia cerebral. Se observa la escasez de estas áreas en los animales enriquecidos, incluso de edad avanzada.

4.2.2.1.3. Estudio conductual.

Tablero de agujeros

Los resultados obtenidos en relación al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre el comportamiento de los animales en el tablero de agujeros se muestran en la tabla 37 y la figura 94.

Con respecto a la **deambulación sobre el tablero**, la edad produjo un efecto general sobre la externa, interna, central ($P<0,05$) y total ($P<0,01$). La deambulación externa, considerada como un parámetro de locomoción general, fue menor en muy viejos con respecto a los adultos ($P<0,05$). También, las deambulaciones interna y central, fueron más bajas en muy viejos en relación a las mostradas por adultos y viejos ($P<0,05$, respectivamente). En el caso de la deambulación por el centro del tablero, se observó interacción entre la condición de enriquecimiento y la edad de los individuos en que fue aplicada ($P<0,05$). No obstante, el análisis *posthoc* no reveló diferencias significativas entre ninguno de los grupos comparados, tan sólo una tendencia hacia la disminución de esta

Tabla 37. Comportamiento en el tablero de agujeros de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Tablero con agujeros	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
Deambulaci3n externa (n°)	178,36±12,94	179,67±15,30	159,57±23,82	176,50±10,95	120,83±14,74	148,83±11,80
Deambulaci3n interna (n°)	109,14±7,59	104,33±7,37	103,57±19,82	132,83±13,56	82,83±23,06	64,83±18,38
Deambulaci3n central (n°)	30,36±2,97	24,50±2,56	22,14±4,87	36,83±5,62	19,83±7,67	13,17±4,70
Deambulaci3n total (n°)	287,50±14,88	284,00±20,22	263,14±39,61	309,33±23,93	203,67±32,56	213,67±28,37
Deambulaci3n interna (%)	38,43±2,26	37,33±1,75	38,57±3,30	42,67±1,38	38,67±4,57	26,67±6,36
Deambulaci3n central (%)	10,57±0,90	8,67±0,73	8,29±1,43	11,67±1,12	8,50±1,78	5,17±1,72
Frecuencia exploratoria (n°)	27,71±2,47	24,08±2,44	22,43±2,87	25,83±1,25	24,83±3,88	19,67±3,25
Tiempo de exploraci3n (s)	38,23±5,53	39,09±4,98	31,96±8,03	35,58±3,24	34,90±4,08	34,13±9,46
Postura erguida (n°)	29,21±4,16	31,25±4,06	18,57±3,26	32,33±4,64	8,83±2,14	8,67±2,25
Acicalamiento (n°)	0,64±0,17	0,67±0,22	0,86±0,34	0,83±0,17	1,17±0,48	0,83±0,40
Defecaciones (n°)	3,07±0,58	2,00±0,39	3,43±0,78	4,33±1,86	1,5±1,12	1,33±0,71

Se muestra la media ± el error estandar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo n3mero de sujetos.

conducta en muy viejos enriquecidos con respecto a los adultos control ($P=0,066$). La deambulaci3n total, obtenida de la suma de la externa y la interna, fue consecuentemente menor en muy viejos con respecto a adultos ($P<0,01$) y viejos ($P<0,05$).

Adem3s se calcul3 el porcentaje de deambulaci3n central, sobre el que se observ3 un efecto global del envejecimiento, as3 como una interacci3n entre el efecto del enriquecimiento y la edad en la que 3ste es aplicado. Los muy viejos tendieron hacia menores porcentajes de deambulaci3n central que los adultos ($P=0,053$) y los viejos ($P=0,082$). El an3lisis *posthoc* en este caso s3 indic3 diferencias estad3sticamente significativas entre muy viejos enriquecidos y adultos control ($P<0,05$). En el caso del porcentaje de deambulaci3n interna, 3nicamente se observaron tendencias, hacia efecto global de la edad

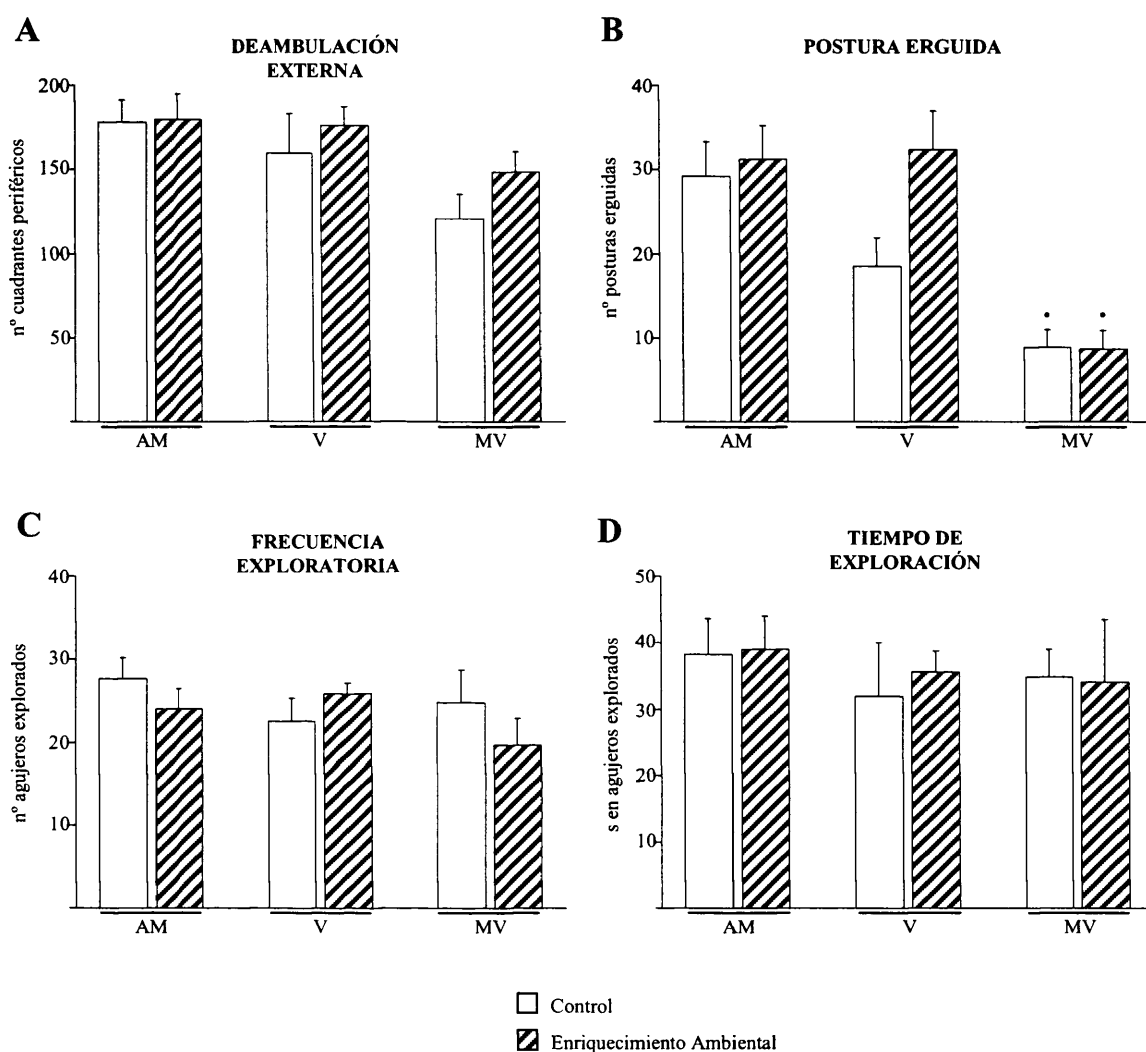


Figura 94. Deambulación externa (n° cuadrantes periféricos) (A), postura erguida (n°) (B), y frecuencia (n° agujeros explorados) (C) y tiempo de exploración (s en agujeros explorados) (D) en el tablero de agujeros, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-14 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (12-14 adultos; 6-7 viejos y muy viejos). * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. Se observa la tendencia hacia más cantidad de posturas erguidas los en viejos enriquecidos que en los controles.

($P=0,094$) y hacia interacción entre ésta y la condición de enriquecimiento ($P=0,087$). De nuevo los muy viejos tendieron hacia menores porcentajes que los viejos ($P=0,091$).

Por otra parte, la edad tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) sobre el número de **posturas erguidas**, considerado en esta prueba como un parámetro de actividad general. Globalmente, los muy viejos hicieron mucha menor cantidad de posturas erguidas durante la prueba que los adultos ($P < 0,001$) y que los viejos ($P < 0,01$). No

obstante, el análisis *posthoc* sólo reveló diferencias significativas entre muy viejos y muy viejos enriquecidos con respecto a los adultos control ($P<0,05$).

La frecuencia de **exploración de los agujeros** del tablero así como el tiempo de exploración de los mismos no mostraron cambios ni con la edad ni con el enriquecimiento ambiental. Tampoco se observaron variaciones en la conducta de **acicalamiento**. Por último, el número de **defecaciones** sí varió con la edad ($P<0,05$), de modo que fue menor en muy viejos que en viejos de manera global ($P<0,05$).

Campo abierto

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre el comportamiento de los animales en el campo abierto se muestran en la tabla 38 y la figura 95.

Tabla 38. Comportamiento en el campo abierto de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Campo abierto	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
Deambulación externa (n°)	99,23±9,62	89,17±6,56	89,29±14,91	98,50±13,05	53,50±4,06	74,83±14,32
Deambulación interna (n°)	32,85±3,12	30,08±2,39	35,14±6,08	44,67±6,98	25,17±7,22	26,67±9,09
Deambulación total (n°)	132,08±10,97	119,25±8,30	124,43±19,46	143,17±19,46	78,67±8,40	101,50±22,68
Deambulación interna (%)	25,38±1,93	25,50±1,20	28,14±2,75	31,00±1,57	29,50±6,68	20,50±6,15
Tiempo de inmovilidad (s)	0,72±0,72	0,24±0,13	0	0	5,66±3,85	2,32±1,93
Postura erguida (n°)	14,31±1,80	13,58±1,79	12,43±2,82	19,67±4,72	2,83±2,07	2,83±1,80
Acicalamiento (n°)	1,08±0,33	1,17±0,24	0,86±0,40	1,33±0,42	1,50±0,43	1,17±0,60
Defecaciones (n°)	2,00±0,57	2,33±0,41	3,00±0,62	1,67±0,42	1,50±0,62	1,67±0,49

Se muestra la media ± el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos.

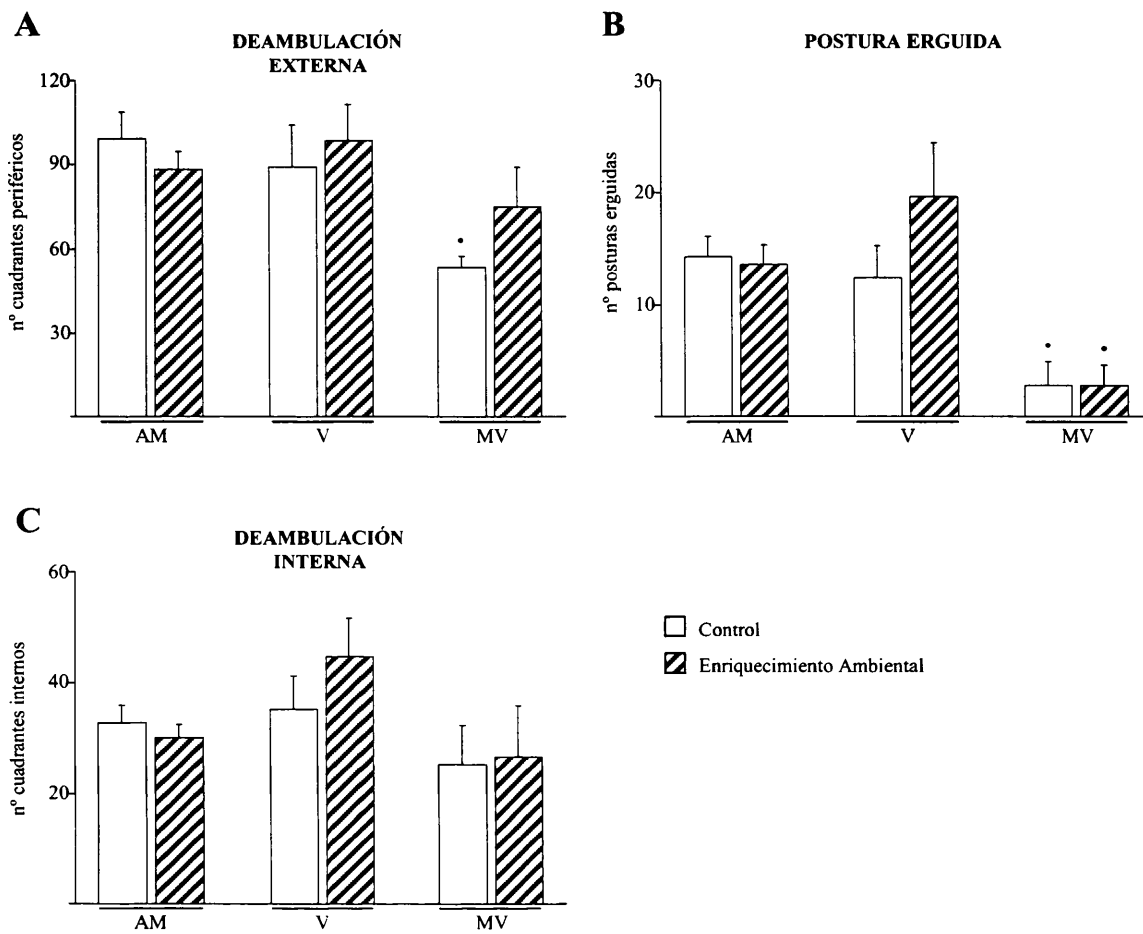


Figura 95. Deambulación externa (n° cuadrantes periféricos) (A), postura erguida (n°) (B), y deambulación interna (n° cuadrantes internos) (C) en el campo abierto, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (12-13 adultos; 6-7 viejos y muy viejos). * $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. Se observa la tendencia hacia mayor deambulación externa en los muy viejos enriquecidos que en sus correspondientes controles de edad, y hacia más cantidad de posturas erguidas y mayor deambulación interna en los viejos enriquecidos que en los controles.

La edad produjo un efecto general sobre la **deambulación** externa ($P < 0,05$), que fue menor en muy viejos que en adultos ($P < 0,05$) y que en viejos ($P = 0,053$). No obstante, el análisis *posthoc* sólo reveló diferencias estadísticamente significativas entre muy viejos control y adultos control, mostrando los muy viejos enriquecidos valores similares a éstos. La deambulación interna tendió a disminuir con el envejecimiento ($P = 0,062$), de modo que los muy viejos tendieron a deambular menos por el interior del campo abierto que los viejos ($P = 0,061$). Así, la deambulación total, suma de las anteriores, disminuyó con la edad ($P < 0,05$), mostrando los muy viejos menores valores que los adultos y los viejos ($P < 0,05$,

respectivamente). Se calculó también el porcentaje de deambulación interna, que no mostró variaciones entre ninguno de los grupos comparados.

De nuevo, la edad tuvo un efecto altamente significativo ($P<0,001$) sobre el número de **posturas erguidas**. Globalmente, los muy viejos hicieron mucha menor cantidad de posturas erguidas durante la prueba que los adultos y que los viejos ($P<0,001$, respectivamente). El análisis *posthoc* sólo reveló diferencias significativas entre muy viejos control y enriquecidos con respecto a los adultos control ($P<0,05$).

También, la edad produjo un efecto general sobre el **tiempo de inmovilidad** ($P<0,05$), que fue mayor globalmente en muy viejos que en adultos y viejos ($P<0,05$, respectivamente). El análisis estadístico profundo reveló diferencias significativas únicamente entre muy viejos y adultos control ($P<0,05$), pero no entre los muy viejos enriquecidos y éstos. Los muy viejos control también mostraron más tiempo de inmovilidad que los viejos control ($P<0,05$), diferencias que desaparecieron en los muy viejos enriquecidos.

No se observaron cambios con respecto a la conducta de **acicalamiento** ni al número de **defecaciones**.

Laberinto elevado en cruz

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre el comportamiento de los animales en el laberinto en cruz elevado se muestran en la tabla 39 y la figura 96.

Ni edad ni enriquecimiento tuvieron un efecto significativo sobre la **entrada** de los animales **en los brazos abiertos** del laberinto, determinada tanto como número, como en porcentaje.

No obstante, el enriquecimiento ambiental sí que produjo un efecto global sobre el número de **entradas en los brazos cerrados** del laberinto ($P<0,01$), aumentándolo. La edad también tuvo un efecto general sobre este parámetro ($P<0,05$), de modo que fue menor en muy viejos en relación a los adultos ($P<0,05$). El análisis *posthoc* reveló que el aumento del número de entradas en los brazos cerrados se produce en los viejos enriquecidos con respecto a los controles ($P<0,05$). Sin embargo, el porcentaje de entradas en los brazos cerrados no varió en función de la edad o el enriquecimiento.

Tabla 39. Comportamiento en el laberinto en cruz elevado de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Laberinto en cruz elevado	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
Entradas en abiertos (n°)	9,55±1,93	8,36±1,07	7,14±1,08	9,50±1,86	7,00±1,70	5,00±1,03
Entradas en cerrados (n°)	15,55±0,97	16,91±1,59	12,00±1,21	19,33±1,82	10,80±1,93	13,67±1,89
Entradas totales (n°)	25,09±2,06	25,27±2,03	19,14±1,30	28,83±2,56	17,80±2,52	18,67±2,06
Entradas en abiertos (%)	35,00±5,63	32,91±3,23	37,43±5,46	32,17±5,02	39,40±7,34	27,33±4,86
Entradas en cerrados (%)	65,00±5,63	67,09±3,23	62,71±5,46	67,83±5,02	60,60±7,34	72,67±4,86
Tiempo en abiertos (s)	74,86±14,56	55,83±9,06	79,68±13,10	61,12±12,94	74,95±15,76	33,04±7,05
Tiempo en cerrados (s)	98,74±8,29	116,58±7,44	82,46±10,10	112,04±9,92	80,32±12,39	135,52±12,43
Tiempo en central (s)	126,40±10,60	127,59±9,64	137,86±11,04	126,84±15,51	144,73±3,74	132,44±11,50
Tiempo total brazos (s)	173,60±10,60	172,41±9,64	162,14±11,04	173,16±15,51	155,27±3,74	167,56±11,50
Tiempo en abiertos (%)	40,55±6,32	31,09±4,19	48,29±6,04	33,83±5,44	47,40±9,47	20,00±4,34
Tiempo en cerrados (%)	59,45±6,32	68,91±4,19	51,71±6,04	66,17±5,44	52,60±9,47	80,00±4,34

Se muestra la media ± el error estándar de 5-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos.

En el caso del número de **entradas totales** en alguno de los brazos del laberinto en cruz, la edad produjo un efecto general sobre el mismo ($P<0,05$), de modo que fue menor globalmente en los muy viejos con respecto a los adultos ($P<0,01$). La misma tendencia se observó en los muy viejos al compararlos con los viejos ($P=0,089$). El enriquecimiento tendió a aumentar este parámetro ($P=0,061$), existiendo también una tendencia hacia la interacción entre el efecto del ambiente enriquecido y la edad de los individuos en los que es aplicado ($P=0,074$). Así, el análisis *posthoc* reveló que esta tendencia al aumento se produce únicamente en los viejos enriquecidos con respecto a los controles ($P=0,062$).

El **tiempo** absoluto empleado en los **brazos abiertos** del laberinto en cruz fue menor en los animales enriquecidos con respecto a los controles ($P<0,05$). También, el porcentaje de tiempo empleado por los ratones en los brazos abiertos fue menor en el caso de los enriquecidos en relación a los no enriquecidos ($P<0,01$). En este caso, el análisis

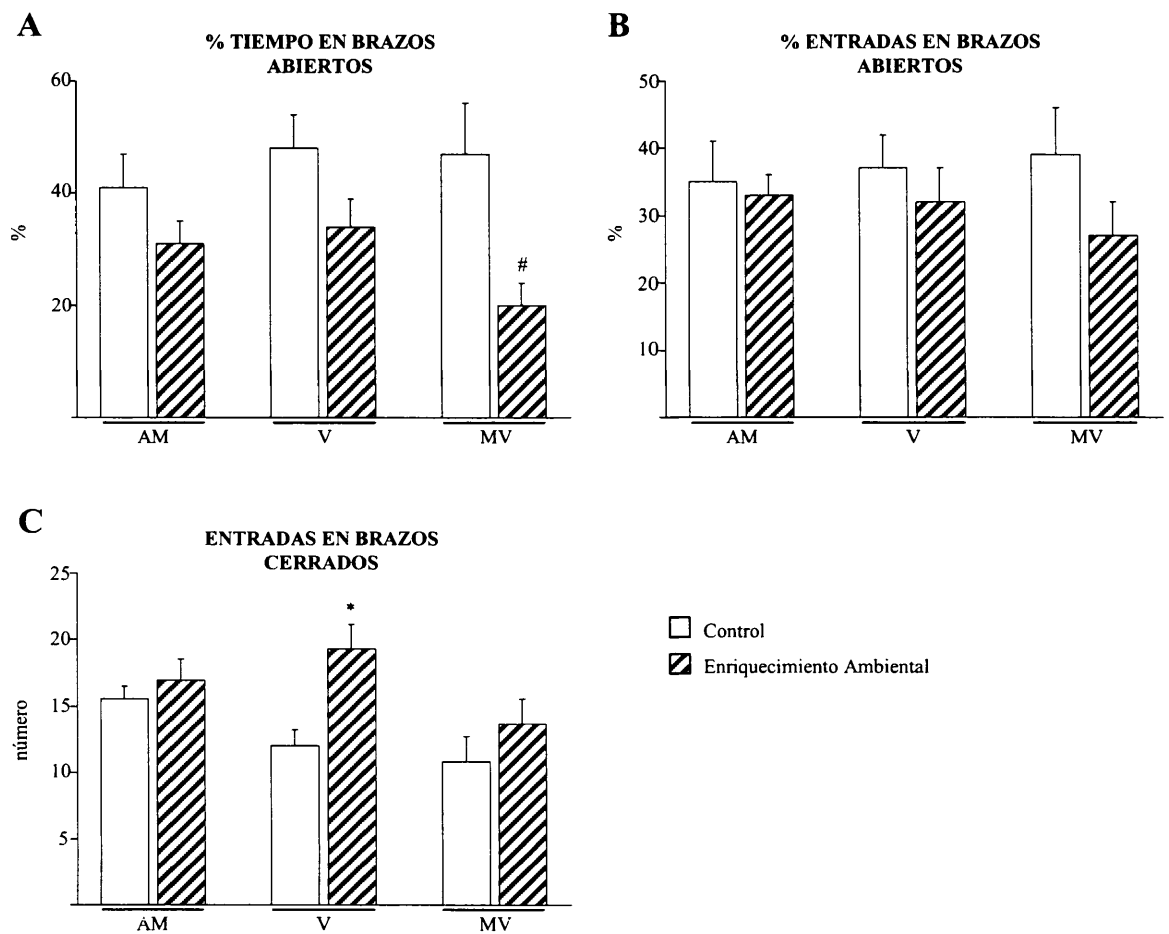


Figura 96. Tiempo en brazos abiertos (%) (A), entradas en brazos abiertos (%) (B), y entradas en brazos cerrados (nº) (C) en el laberinto en cruz elevado, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-11 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (11 adultos; 6-7 viejos; 5-6 muy viejos). * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no enriquecido. Se observa el menor porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos por los ratones enriquecidos que en los controles ($P < 0,01$), especialmente en los muy viejos. Un perfil similar aparece en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos, si bien en este caso no llegó a ser significativo.

posthoc reveló una tendencia a la disminución en los muy viejos enriquecidos con respecto a los controles de su misma edad ($P = 0,095$), que se hizo significativa al compararlos con los viejos control ($P < 0,05$).

Por el contrario, el **tiempo empleado en los brazos cerrados** del laberinto fue mayor en los animales enriquecidos que en los controles ($P < 0,001$). De esta forma, los muy viejos enriquecidos pasaron más tiempo en los brazos cerrados que los muy viejos y que los viejos control ($P < 0,05$, respectivamente). Un perfil similar se observó para el porcentaje de tiempo empleado en los brazos cerrados, que también aumentó con el enriquecimiento

($P<0,01$), mostrando los muy viejos enriquecidos una tendencia hacia mayores valores que sus controles ($P=0,095$), que se hizo significativa al compararlos con los viejos control ($P<0,05$).

No obstante, no se observaron cambios con respecto al tiempo total empleado en alguno de los brazos del laberinto ni al que pasaron en su parte central.

Test de Porsolt o de natación forzada

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del enriquecimiento ambiental a lo largo de la edad sobre el comportamiento de los animales en la prueba de Porsolt de natación forzada se muestran en la tabla 40 y las figuras 97,98.

Tabla 40. Comportamiento en el test de Porsolt de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros, viejos y muy viejos controles (C) y con enriquecimiento ambiental (EA).

Test de Porsolt	Adultos		Viejos		Muy Viejos	
	C	EA	C	EA	C	EA
<u>DÍA 1</u>						
Tiempo de latencia (s)	104,99±10,00	97,63±6,69	98,62±23,92	145,79±31,66	54,48±23,24	79,09±29,01
Tiempo de inmovilidad (s)	113,12±12,92	103,30±13,07	70,51±18,78	64,40±21,86	125,14±30,60	69,79±18,24
Tiempo de natación (s)	53,38±6,01	46,26±5,99	81,01±23,26	119,12±21,59	36,33±13,40	44,87±6,13
Tiempo de conductas de escape (s)	16,43±3,65	8,86±1,38	11,89±5,05	6,63±2,38	8,99±3,15	1,52±0,81
<u>DÍA 2</u>						
Tiempo de latencia (s)	38,20±7,29	30,62±7,82	67,43±28,78	51,63±19,26	41,15±14,78	29,61±4,74
Tiempo de inmovilidad (s)	137,76±13,14	152,56±22,23	132,07±35,27	125,69±26,14	124,93±22,95	128,57±32,74
Tiempo de natación (s)	31,76±5,10	35,11±10,00	54,65±18,47	67,56±20,77	40,31±9,70	38,67±8,37
Tiempo de conductas de escape (s)	8,32±2,32	1,02±0,46	1,97±1,11	0,20±0,10	5,22±3,72	1,09±0,68

Se muestra la media ± el error estándar de 5-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos.

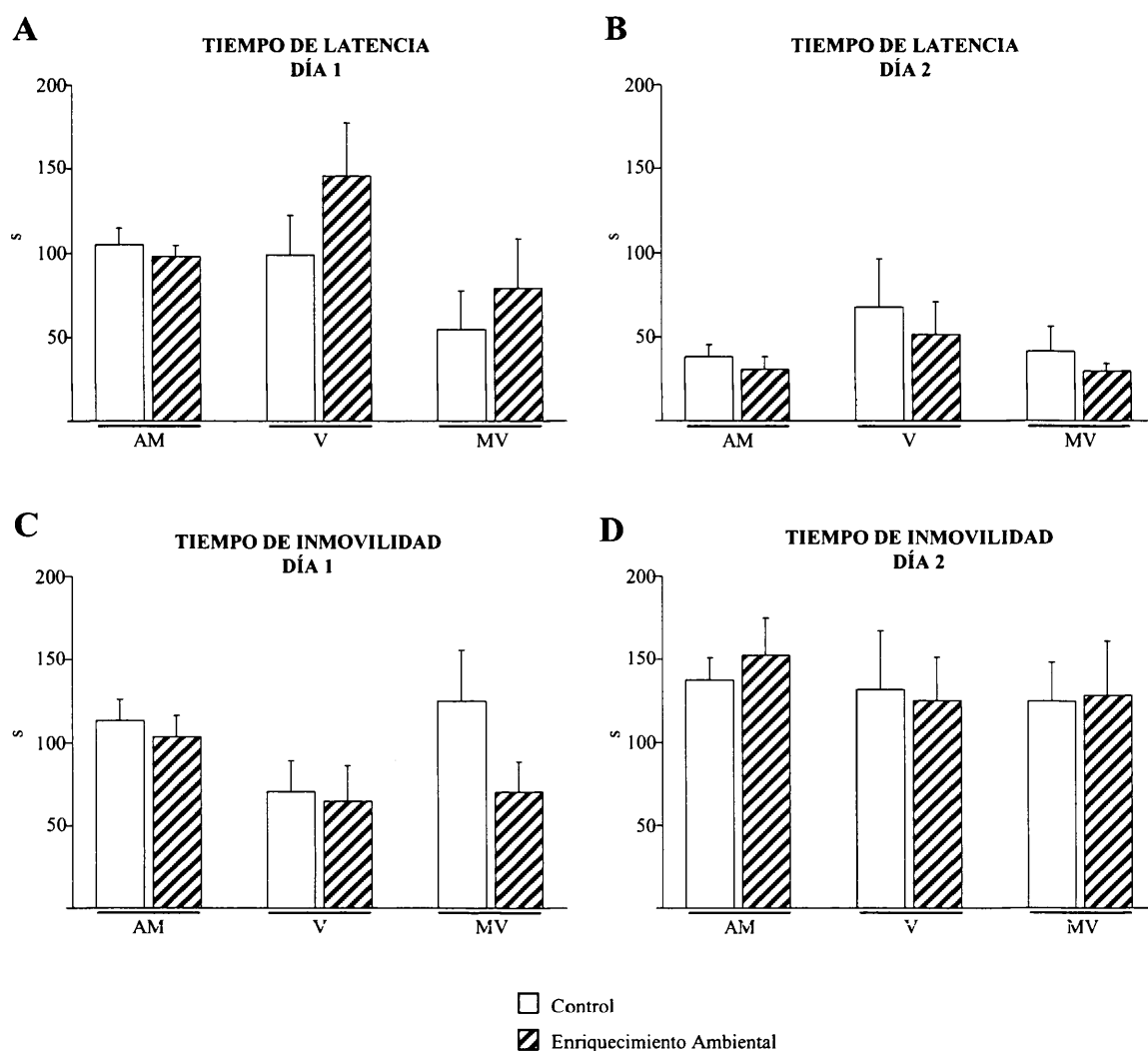


Figura 97. Tiempo de latencia hasta alcanzar la primera inmovilidad completa en los días 1 (A) y 2 (B), y tiempo de inmovilidad en los días 1 (C) y 2 (D) (segundos) en el test de Porsolt, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (12-13 adultos; 6-7 viejos; 5-6 muy viejos). En el día 1 se observa la tendencia hacia mayor tiempo de latencia hasta alcanzar la primera flotación en los viejos enriquecidos en comparación con los controles, y hacia menor tiempo de inmovilidad en los muy viejos enriquecidos con respecto a sus correspondientes controles de edad. Estas tendencias desaparecen en el día 2.

La edad produjo un efecto global sobre el **tiempo de latencia** a la primera inmovilidad completa en el primer día de la prueba ($P < 0,05$), de manera que fue menor en los muy viejos que en los viejos ($P < 0,05$). Este tiempo de latencia en el día 2 fue menor en todos los grupos, de modo que estas diferencias desaparecieron.

Con respecto al **tiempo de inmovilidad**, en el día 1 existió una tendencia hacia un efecto general del envejecimiento ($P = 0,067$), tendiendo a ser menor en viejos que en

adultos ($P=0,054$). El tiempo de inmovilidad en el segundo día de la prueba fue mayor en todos los grupos, y similar para todos ellos (Fig. 97).

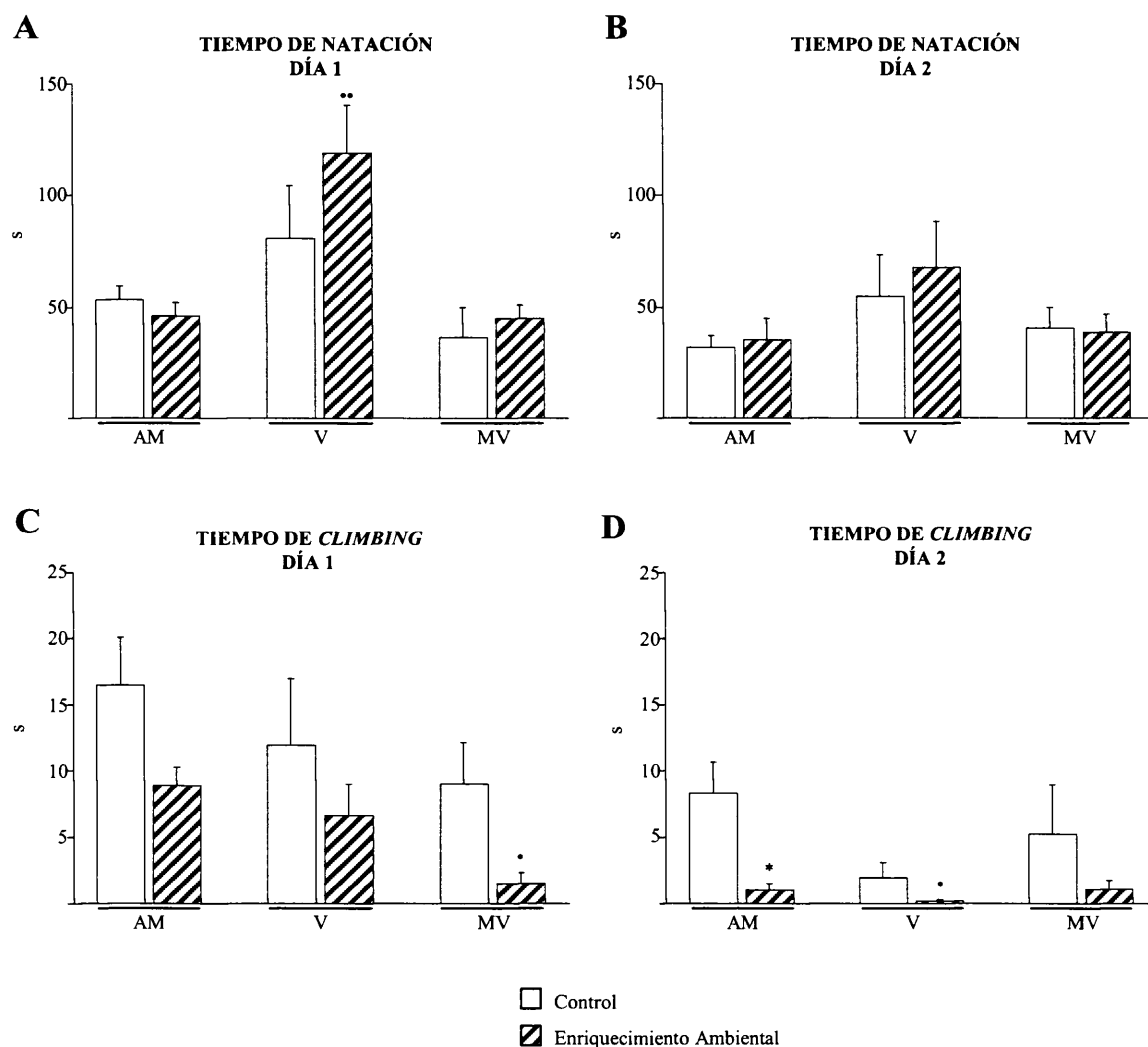


Figura 98. Tiempo de natación en los días 1 (A) y 2 (B), y tiempo empleado en conductas de escape (*climbing*) en los días 1 (C) y 2 (D) (segundos) en el test de Porsolt, de ratones hembras ICR/CD1 adultos maduros (AM), viejos (V) y muy viejos (MV) controles y con enriquecimiento ambiental. Cada columna representa la media \pm el error estándar de 5-13 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (12-13 adultos; 6-7 viejos; 5-6 muy viejos). * $P<0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo grupo de edad; ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de edad adulta no enriquecido. Se observa el menor tiempo dedicado a las conductas de escape por los animales enriquecidos en comparación con los controles en ambos días de la prueba ($P<0,05$ y $P<0,01$ para los días 1 y 2, respectivamente).

La edad produjo un efecto general sobre el **tiempo de natación** en el día 1 de la prueba de natación forzada ($P<0,001$), de manera que fue mayor globalmente en los viejos

con respecto a adultos y muy viejos ($P<0,001$). El análisis *posthoc* reveló que en ese día los viejos enriquecidos nadaron más que los adultos control ($P<0,01$).

El tiempo de natación fue menor en el segundo día de la prueba, de forma que sólo se observó una tendencia hacia efecto global de la edad ($P=0,064$), mostrando los viejos únicamente una tendencia hacia mayor tiempo de natación que los adultos ($P=0,057$).

Por otra parte, el **tiempo empleado en conductas de escape** (*climbing*) en el día 1 del test fue menor en los animales enriquecidos que en los controles ($P<0,05$). También se observó una tendencia hacia un efecto global de la edad ($P=0,101$), tendiendo los muy viejos hacia menores tiempos empleados en este tipo de conductas que los adultos ($P=0,064$). El análisis *posthoc* reveló diferencias estadísticamente significativas entre los muy viejos enriquecidos y los adultos control ($P<0,05$).

El tiempo de las conductas de escape fue menor en el segundo día de la prueba que en el primero, para todos los grupos. No obstante, los animales enriquecidos siguieron haciendo menos tiempos de *climbing* que los no enriquecidos ($P<0,01$). El análisis *posthoc* reveló diferencias estadísticamente significativas entre los adultos enriquecidos y los controles ($P<0,05$). También los viejos enriquecidos mostraron menos tiempo de *climbing* en este día 2 de la prueba que los adultos control ($P<0,05$), y la misma tendencia se observó en los muy viejos enriquecidos ($P=0,083$) (Fig. 98).

4.2.2.1.4. Longevidad.

En la figura 99 se representan los resultados correspondientes al efecto del enriquecimiento ambiental, iniciado en la edad adulta y continuado hasta la muerte natural del individuo, sobre la supervivencia de los ratones.

El test de Kaplan-Meier reveló una tendencia hacia mayor longevidad media en los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido que en los controles ($82,08\pm6,88$ vs. $79,21\pm4,16$ semanas, $P=0,065$). Además, el último animal control murió a las 95 semanas, mientras que el enriquecimiento logró aumentar la longevidad máxima del lote de animales en un 13%, llegando éstos a alcanzar las 107 semanas.

Dado el número de sujetos, se calculó también la mediana, o percentil 50, para ambos grupos experimentales, y se observó que la mitad de la población control apenas superó las 80 semanas de edad, mientras que en el caso de los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido, la mitad de la población murió por encima de las 90 semanas de edad ($91,29\pm1,19$ vs. $100,33\pm2,51$, $P<0,01$) (Fig. 100).

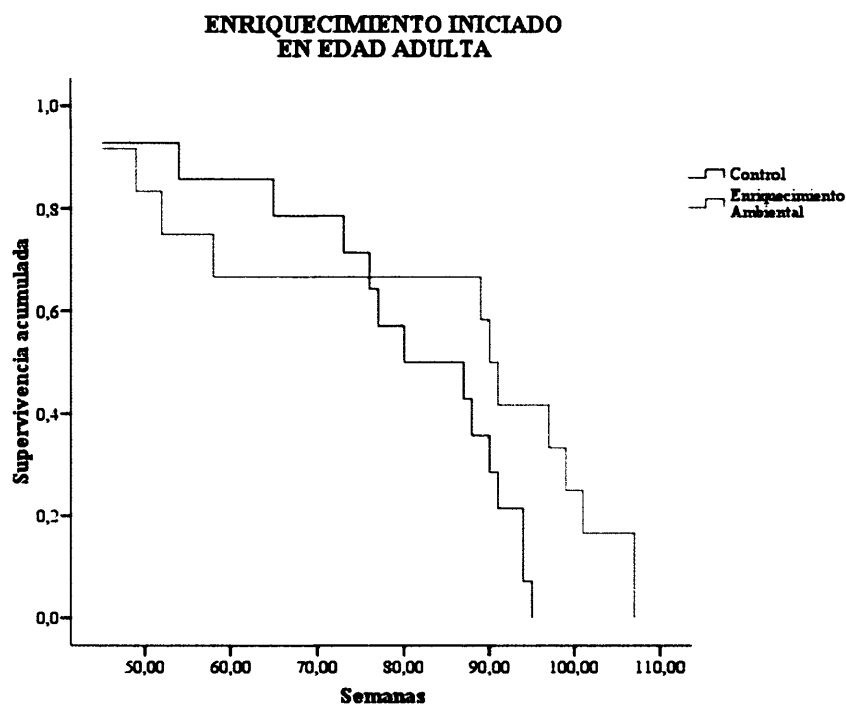


Figura 99. Supervivencia acumulada (semanas) de ratones hembras ICR/CD1 controles y con enriquecimiento ambiental iniciado en la edad adulta. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental (14 controles; 12 enriquecidas). Se observa la tendencia hacia mayor longevidad media de los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido.

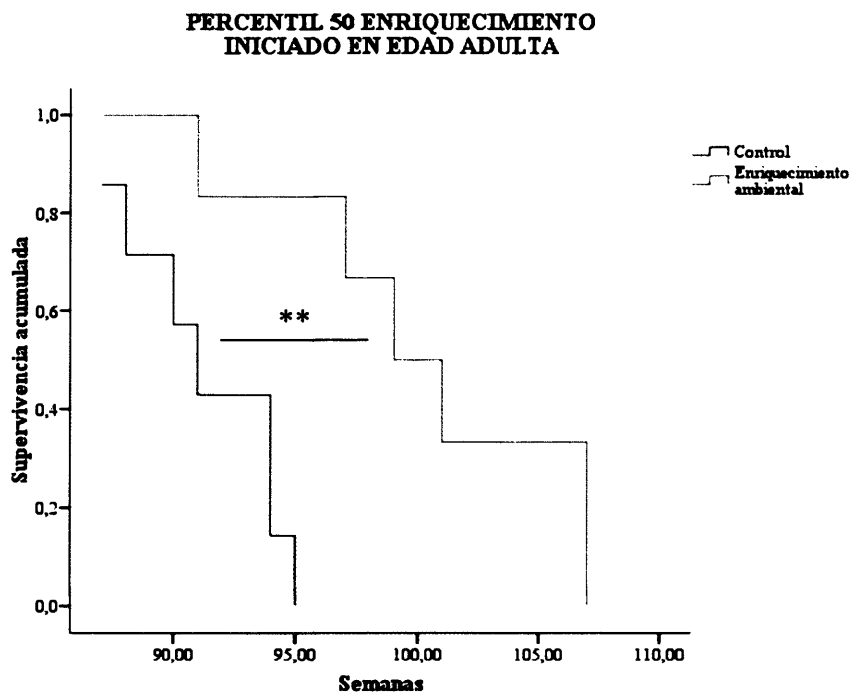


Figura 100. Supervivencia acumulada (semanas) para el percentil 50 de ratones hembras ICR/CD1 controles y con enriquecimiento ambiental iniciado en la edad adulta. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental (7 controles; 6 enriquecidas). El análisis estadístico de Kaplan-Meier reveló diferencias estadísticamente significativas en la longevidad media de ambos grupos experimentales, Log Rank (Mantel-Cox) $P < 0,01$.

En la figura 101 se representan los resultados correspondientes al efecto del enriquecimiento ambiental, iniciado en la edad avanzada (viejos) y muy avanzada (muy viejos), y continuado hasta la muerte natural de los individuos, sobre la supervivencia de los mismos.

El test de Kaplan-Meier no reveló diferencias significativas en la longevidad media de los animales que habían vivido en un ambiente enriquecido desde viejos o desde muy viejos con respecto a sus correspondientes controles no enriquecidos ($88,86 \pm 8,92$ vs. $95,00 \pm 10,09$, y $99,29 \pm 4,08$ vs. $96,86 \pm 6,35$ semanas, respectivamente) (Fig. 102).

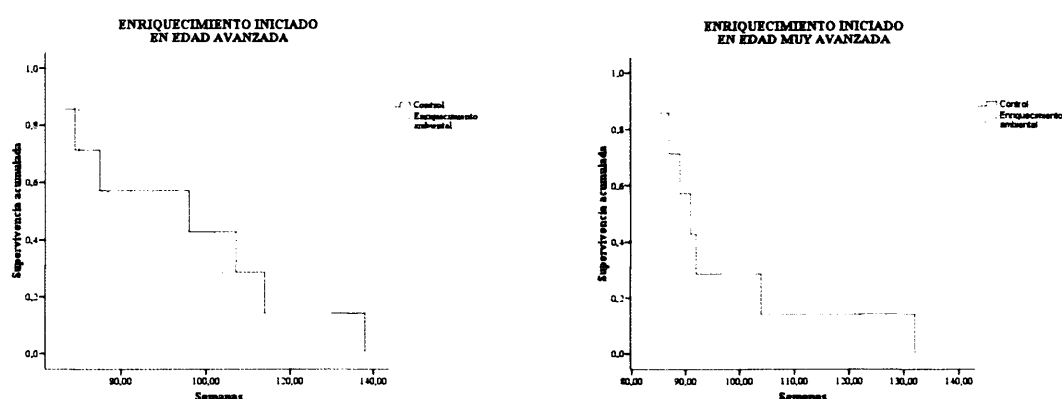


Figura 101. Supervivencia acumulada (semanas) de ratones hembras ICR/CD1 controles y con enriquecimiento ambiental iniciado en la edad avanzada (viejos) o muy avanzada (muy viejos). Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental (7 viejos control y 7 enriquecidas; 7 muy viejos control y 7 enriquecidas).

4.2.2.2. Efecto del ambiente enriquecido en los cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, y en los niveles plasmáticos de corticosterona, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad.

4.2.2.2.1. Función linfocitaria: *Quimiotaxis, proliferación y actividad NK*

Los resultados relativos a la función de linfocitos de bazo y timo se muestran en las tablas 41-44 y en las figuras 102-104.

Tabla 41. Índice de quimiotaxis (número de linfocitos), proliferación (cuentas por minuto) no estimulada (basal) y estimulada con concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS), y actividad *Natural Killer* (% lisis) de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Función linfocitos		Viejos NTg		Viejos 3xTgAD	
		C	EA	C	EA
Índice quimiotaxis (n° linfocitos)					
Bazo	Hembras	5510±340	7419±444	8468±338	7982±497
	Machos	4227±377	3442±144	4371±448	1712±83
Timo	Hembras	5766±298	7591±584	8544±411	5948±234
	Machos	4295±246	4730±391	5141±344	1952±188
Proliferación basal (cuentas por minuto)					
Bazo	Hembras	1088±198	1005±133	1321±255	1285±539
	Machos	873±170	1005±173	1462±471	2148±778
Timo	Hembras	427±35	491±80	536±59	438±159
	Machos	306±31	373±51	421±26	500±119
Proliferación en respuesta a ConA (cuentas por minuto)					
Bazo	Hembras	2176±398	2106±106	2577±327	2227±412
	Machos	2287±183	3320±355	2187±234	2918±312
Timo	Hembras	423±41	729±127	377±33	539±200
	Machos	273±19	535±101	427±36	934±273
Proliferación en respuesta a LPS (cuentas por minuto)					
Bazo	Hembras	13809±1373	8108±316	13373±554	8593±1297
	Machos	14080±1077	11381±1487	6434±1094	5841±733
Timo	Hembras	480±42	643±176	435±69	552±184
	Machos	307±41	408±66	407±36	724±121
Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)					
Bazo	Hembras	38±4	54±4	33±3	50±1
	Machos	35±2	43±2	31±1	48±5
Timo	Hembras	54±2	57±2	45±2	68±3
	Machos	52±2	73±2	13±2	53±4

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer; C = controles no enriquecidos; EA = enriquecimiento ambiental.

Con respecto a la **quimiotaxis** de los linfocitos esplénicos, el enriquecimiento tuvo un efecto diferencial sobre animales no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer ($P<0,001$), que además fue diferente dependiendo del sexo de los individuos ($P<0,001$) (Tabla 41,42). De esta forma, el enriquecimiento ambiental produjo un aumento ($P<0,01$) en la quimiotaxis de linfocitos procedentes de bazo de hembras no transgénicas, mientras que no tuvo efecto alguno en los machos. Por el contrario, el ambiente enriquecido condujo a una disminución ($P<0,01$) de función en machos transgénicos, sin dar lugar a cambios en las hembras (Fig. 102A).

Tabla 42. Pruebas de los efectos inter-sujetos para el índice de quimiotaxis de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Índice quimiotaxis (n° linfocitos)	Bazo	Timo
EA	ns ($P=0,078$)	**
Tg	ns ($P=0,091$)	ns
Sexo	***	***
EA*Tg	***	***
EA*Sexo	***	ns
Tg*Sexo	***	*
EA*Tg*Sexo	ns	ns

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$, ns = no significativo.

En el caso de los linfocitos tímicos, la intervención ambiental disminuyó ($P<0,01$) de manera global la función quimiotáctica, si bien su efecto también fue diferencial sobre animales no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer ($P<0,001$) (Tabla 41,42). Así, el análisis *posthoc* reveló que de hecho el enriquecimiento sólo produce esa disminución en individuos transgénicos, tanto en hembras ($P<0,01$) como en machos ($P<0,001$), encontrándose en las hembras triple transgénicas control en niveles elevados con respecto a las hembras no transgénicas ($P<0,001$) (Fig. 102B).

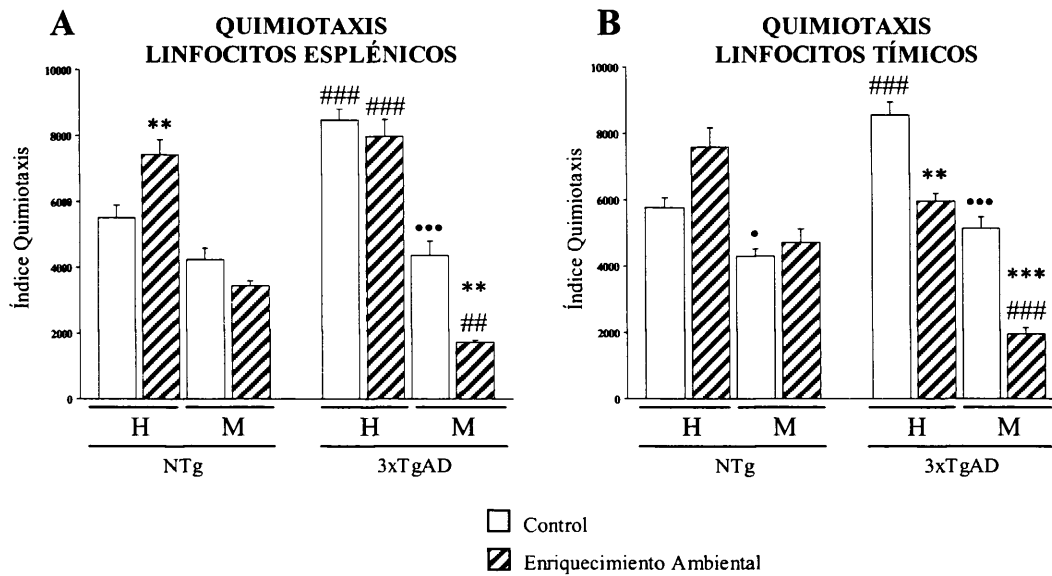


Figura 102. Índice de quimiotaxis (número de células) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-10 hembras y machos viejos no transgénicos control, y hembras viejas triple transgénicas control; 11-12 hembras viejas no transgénicas enriquecidas; 6-8 machos viejos no transgénicos enriquecidos, y triple transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas enriquecidas). Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo sexo y grupo; ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos control del mismo sexo; *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

En relación a la **linfoproliferación**, cabe destacar un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) del enriquecimiento ambiental aumentando la respuesta proliferativa de los linfocitos tímicos al mitógeno concanavalina A tanto en hembras como en machos viejos no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Tabla 41,43). También en timo, la intervención ambiental produjo un aumento ($P < 0,05$) global de la proliferación linfocitaria ante el estímulo lipopolisacárido (Tabla 41,43).

Sin embargo, en bazo, el ambiente enriquecido condujo a una disminución ($P < 0,001$) global de la linfoproliferación en respuesta a lipopolisacárido, observándose un efecto diferencial en función del sexo ($P < 0,05$) (Tabla 41,43). El análisis estadístico profundo reveló que esta disminución se produce fundamentalmente en hembras, y especialmente en las no transgénicas ($P < 0,05$) (Fig. 103A).

Tabla 43. Pruebas de los efectos inter-sujetos para la proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos murinos esplénicos y tímicos no estimulados (basal), y estimulados con concanavalina A y lipopolisacárido.

Proliferación (cpm)	Basal		Concanavalina A		Lipopolisacárido	
	Bazo	Tímo	Bazo	Tímo	Bazo	Tímo
EA	ns	ns	ns	***	***	*
Tg	*	ns	ns	ns	***	ns
Sexo	ns	ns	ns ($P=0,067$)	ns	*	ns
EA*Tg	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EA*Sexo	ns	ns	*	ns	*	ns
Tg*Sexo	ns	ns	ns	*	***	ns
EA*Tg*Sexo	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P<0,001$, * $P<0,05$, ns = no significativo.

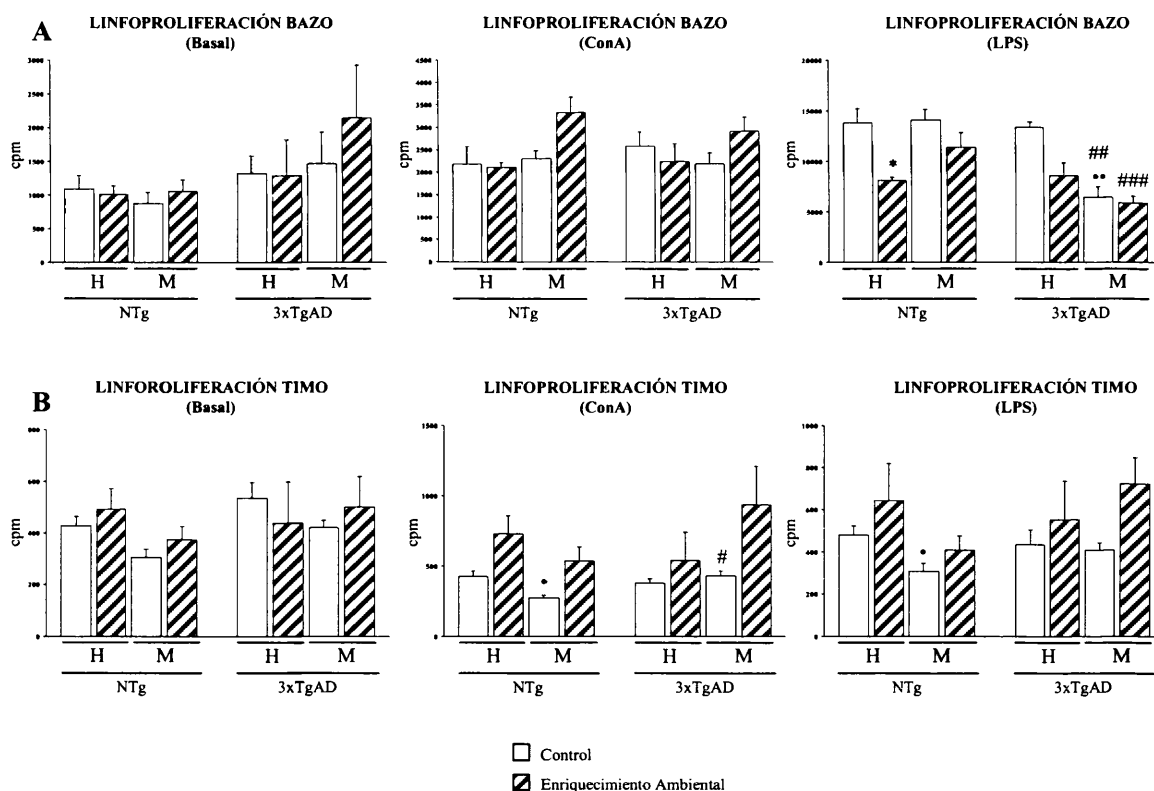


Figura 103. Proliferación (cuentas por minuto) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B) no estimulados (basal) y estimulados con concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-12 hembras y machos viejos no transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas control; 6-7 machos viejos triple transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas enriquecidas). Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. * $P<0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo sexo y grupo; ### $P<0,001$, ## $P<0,01$, # $P<0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos control del mismo sexo; ** $P<0,01$, * $P<0,05$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

El ambiente enriquecido tuvo un efecto global aumentando ($P<0,001$) la **actividad NK**, tanto en las células esplénicas como en las tímicas (Tabla 41,44).

Tabla 44. Pruebas de los efectos inter-sujetos para la actividad *Natural Killer* (% lisis) de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)	Bazo	Timo
EA	***	***
Tg	ns	***
Sexo	*	***
EA*Tg	ns	***
EA*Sexo	ns	***
Tg*Sexo	ns	***
EA*Tg*Sexo	ns	ns

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P<0,001$, * $P<0,05$, ns = no significativo.

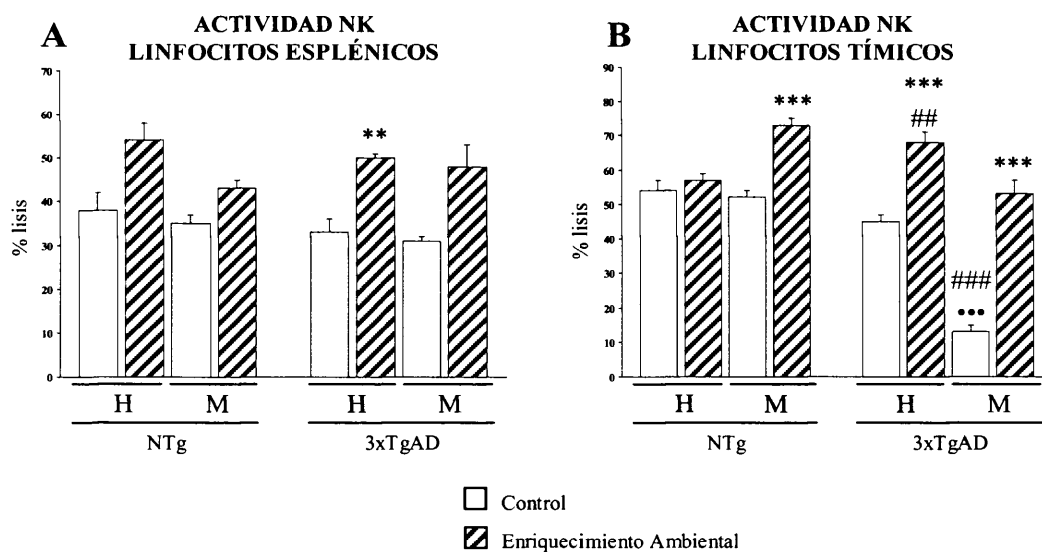


Figura 104. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-12 hembras y machos viejos no transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas control; 6-7 machos viejos triple transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas enriquecidas). Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo sexo y grupo; ### $P<0,001$, ## $P<0,01$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos control del mismo sexo; *** $P<0,001$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

En el caso del bazo, el análisis *posthoc* reveló que, si bien existió una tendencia al aumento en todos los grupos, éste sólo fue significativo en el caso de las hembras transgénicas ($P<0,01$) (Fig. 104A).

Por otra parte, en timo, el efecto del enriquecimiento fue diferencial en individuos no transgénicos y transgénicos ($P<0,001$), y dependió también del sexo de los mismos ($P<0,001$) (Tabla 41,44). Así, dicho aumento ($P<0,001$) se produjo en machos viejos no transgénicos y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, cuyos niveles se encontraban muy disminuidos ($P<0,001$) con respecto a los no transgénicos y alcanzaron los de éstos tras la intervención ambiental, y en hembras transgénicas (Fig. 104B).

4.2.2.2.2. Citoquinas: *Interleuquina 2* y *factor de necrosis tumoral α* .

Las tablas 45,46 y la figura 105 muestran los resultados obtenidos con respecto a los niveles de IL-2 inducidos por concanavalina A y de TNF- α estimulados por lipopolisacárido en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos esplénicos y tímicos.

Tabla 45. Niveles (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, y de TNF- α en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Niveles citoquinas (pg/ml)		Viejos NTg		Viejos 3xTgAD	
		C	EA	C	EA
IL-2					
Bazo	Hembras	37 \pm 5	38 \pm 6	60 \pm 4	41 \pm 7
	Machos	62 \pm 7	75 \pm 2	31 \pm 6	35 \pm 6
Timo	Hembras	17 \pm 2	21 \pm 2	16 \pm 2	23 \pm 2
	Machos	19 \pm 2	14 \pm 2	20 \pm 3	20 \pm 2
TNF-α					
Bazo	Hembras	104 \pm 3	92 \pm 2	157 \pm 12	148 \pm 20
	Machos	99 \pm 5	77 \pm 5	155 \pm 14	139 \pm 11
Timo	Hembras	109 \pm 3	109 \pm 3	121 \pm 6	104 \pm 5
	Machos	108 \pm 3	92 \pm 5	105 \pm 5	107 \pm 7

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer; C = controles no enriquecidos; EA = enriquecimiento ambiental.

En relación al efecto del enriquecimiento ambiental sobre los niveles de **IL-2** en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos en respuesta a concanavalina A, éste fue diferencial en función del sexo de los individuos ($P<0,05$), tanto en bazo como en timo (Tabla 45,46). En bazo, existió una tendencia hacia mayores niveles en machos enriquecidos con respecto a los no enriquecidos, que fue contraria en hembras. En timo se produjo una situación inversa, con tendencia hacia mayores niveles en hembras enriquecidas en relación a las no enriquecidas, y al contrario en machos (Fig. 105A,B).

Tabla 46. Pruebas de los efectos inter-sujetos para los niveles (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, y de TNF- α en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

Niveles citoquinas (pg/ml)	IL-2		TNF- α (pg/ml)	
	Bazo	Timo	Bazo	Timo
EA	ns	ns	*	*
Tg	**	ns	***	ns
Sexo	ns ($P=0,090$)	ns	ns	*
EA*Tg	ns ($P=0,083$)	ns	ns	ns
EA*Sexo	*	*	ns	ns
Tg*Sexo	***	ns	ns	ns
EA*Tg*Sexo	ns	ns	ns	*

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$, ns = no significativo.

Por otra parte, los niveles de **TNF- α** en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos y tímicos en respuesta a lipopolisacárido disminuyeron tras la intervención ambiental ($P<0,05$) (Tabla 45,46). No obstante en timo, se observó interacción entre las variables enriquecimiento, transgenicidad y sexo ($P<0,05$) (Tabla 45,46), que se tradujo en que la tendencia hacia menores niveles de TNF- α consecuencia del enriquecimiento se producía sólo en los machos no transgénicos y en las hembras triple transgénicas para la enfermedad de Alzheimer (Fig. 105A,B).

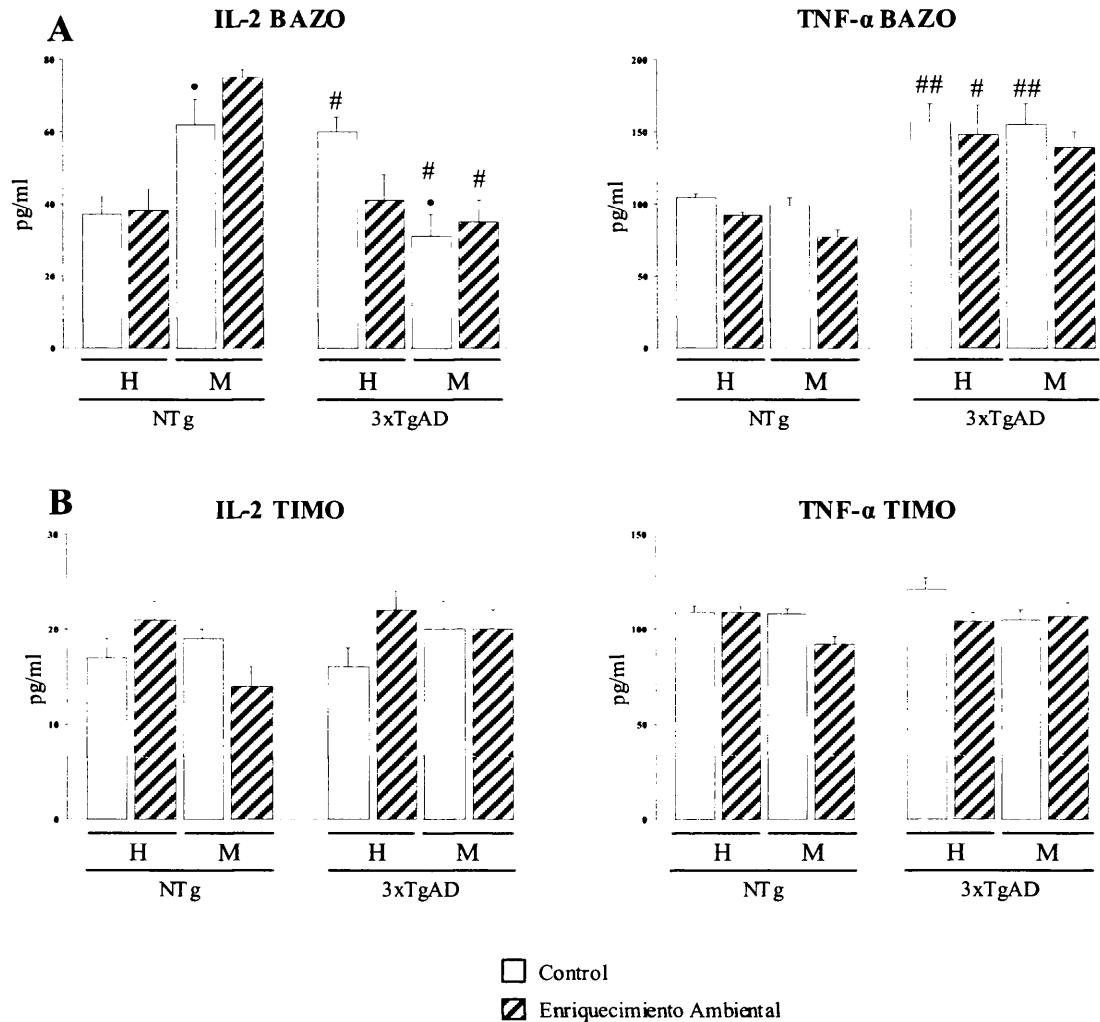


Figura 105. Niveles (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos estimulados con concanavalina A, y de TNF- α en sobrenadantes de cultivos estimulados con lipopolisacárido, de linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-12 hembras y machos viejos no transgénicos control, hembras viejas no transgénicas enriquecidas, y triple transgénicas control; 6-7 machos viejos no transgénicos enriquecidos y triple transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas enriquecidas). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos control del mismo sexo; * $P < 0,05$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

4.2.2.2.3. Defensa antioxidante: Niveles intralinfocitarios de glutathion total.

Las tablas 47,48 y la figura 106 muestran los resultados obtenidos en relación al contenido en glutathion (GSH) de linfocitos esplénicos y tímicos.

Tabla 47. Valores de glutathion (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

GSH linfocitos (nmol/mg proteína)		Viejos NTg		Viejos 3xTgAD	
		C	EA	C	EA
Bazo	Hembras	9,97±1,99	4,24±0,67	12,01±2,60	6,74±0,56
	Machos	2,43±0,31	1,55±0,35	3,41±0,34	2,09±0,37
Timo	Hembras	2,05±0,30	2,02±0,40	1,92±0,34	2,86±0,49
	Machos	2,34±0,31	3,46±0,38	2,82±0,66	1,27±0,11

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer; C = controles no enriquecidos; EA = enriquecimiento ambiental.

El contenido en GSH de los linfocitos esplénicos disminuyó tras la intervención ambiental ($P<0,001$) (Tabla 47,48). Además, el efecto del enriquecimiento fue diferencial en función del sexo ($P<0,05$) (Tabla 47,48), de manera que la tendencia a la disminución fue más importante en hembras, y fundamentalmente en las no transgénicas ($P<0,05$) (Fig. 106A).

En el caso de los linfocitos tímicos, existió interacción entre las variables enriquecimiento, transgenicidad y sexo ($P<0,01$) (Tabla 47,48), que se tradujo en ausencia de cambios tras la intervención ambiental en hembras no transgénicas, y tendencias hacia el aumento para los machos no transgénicos y las hembras transgénicas, y hacia la disminución en los machos transgénicos, que no obstante no llegaron a ser significativas (Fig. 106B).

Tabla 48. Pruebas de los efectos inter-sujetos para los valores de glutatión (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos y tímicos.

GSH linfocitos (nmol/mg proteína)	Bazo	Timo
EA	***	ns
Tg	ns	ns
Sexo	***	ns
EA*Tg	ns	ns
EA*Sexo	*	ns
Tg*Sexo	ns	*
EA*Tg*Sexo	ns	**

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns = no significativo.

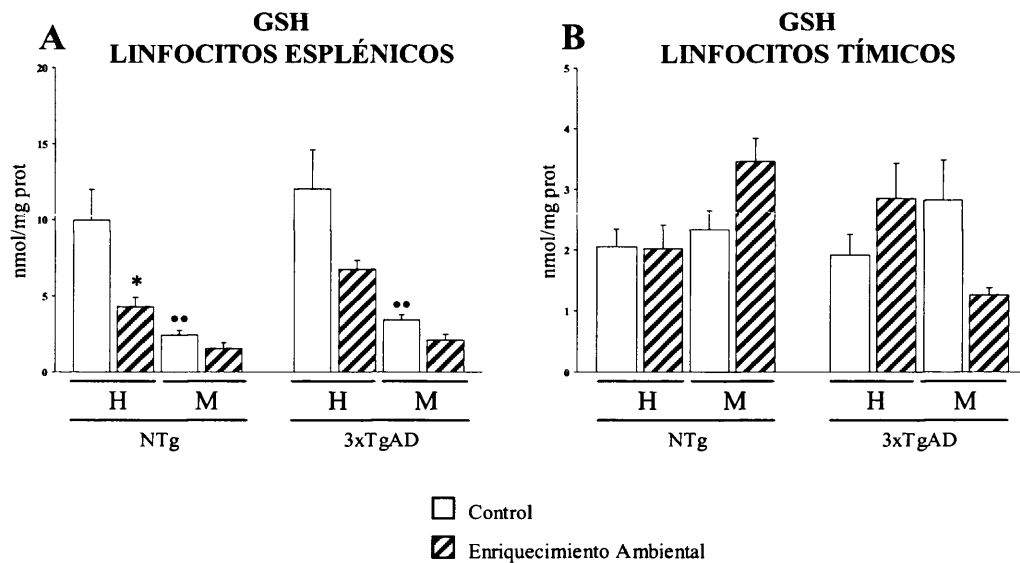


Figura 106. Valores de glutatión (GSH) (nmol/mg proteína) en linfocitos murinos esplénicos (A) y tímicos (B). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (10-12 hembras viejas no transgénicas; 6-9 machos viejos no transgénicos, y hembras viejas triple transgénicas; 6 machos viejos triple transgénicos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. * $P < 0,05$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo sexo y grupo; ** $P < 0,01$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

4.2.2.2.4. Niveles plasmáticos de corticosterona.

Las tablas 49,50 y la figura 107 muestran los resultados obtenidos en cuanto a los niveles plasmáticos de corticosterona.

Tabla 49. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml).

Corticosterona (ng/ml)	Viejos NTg		Viejos 3xTgAD	
	C	EA	C	EA
Hembras	62,80±5,95	99,04±15,81	58,79±9,54	70,90±11,68
Machos	21,90±4,76	13,96±2,11	79,60±5,07	27,85±3,36

Se muestra la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer; C = controles no enriquecidos; EA = enriquecimiento ambiental.

Tabla 50. Pruebas de los efectos inter-sujetos para los niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml).

Corticosterona (ng/ml)	
EA	ns
Tg	ns
Sexo	***
EA*Tg	*
EA*Sexo	***
Tg*Sexo	***
EA*Tg*Sexo	ns

Se muestra el efecto global de las variables enriquecimiento ambiental (EA), transgenicidad (Tg) y sexo, así como las distintas interacciones entre ellas. *** $P<0,001$, * $P<0,05$, ns = no significativo.

El efecto del enriquecimiento sobre los niveles plasmáticos de corticosterona dependió de tratarse de individuos transgénicos o no transgénicos ($P<0,05$), así como del sexo de los mismos ($P<0,001$) (Tabla 49,50). Así, los niveles aumentados ($P<0,001$) de corticosterona plasmática en machos transgénicos en relación a los no transgénicos, disminuyeron ($P<0,001$) hasta el valor de éstos tras la intervención ambiental (Fig. 107).

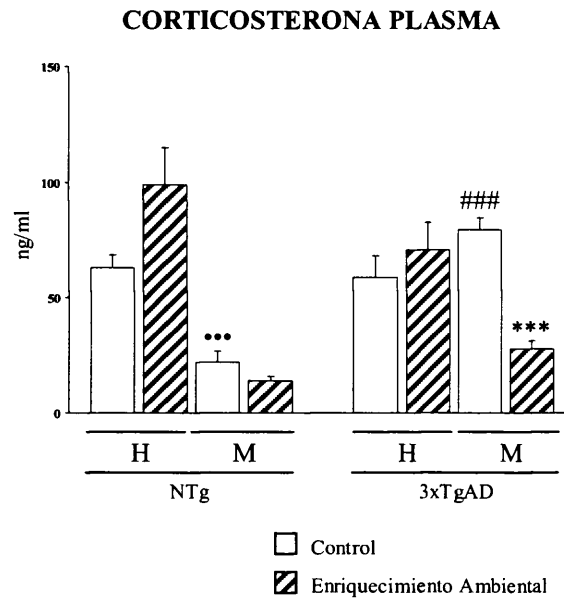


Figura 107. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml). Cada columna representa la media \pm el error estándar de 6-12 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos (8-12 hembras y machos viejos no transgénicos control y enriquecidos, y hembras viejas triple transgénicas control y enriquecidas; 6 machos triple transgénicos control y enriquecidos). Cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $P < 0,001$ con respecto al valor del control no enriquecido del mismo sexo y grupo; ### $P < 0,001$ con respecto al valor del grupo de viejos no transgénicos control del mismo sexo; *** $P < 0,001$ con respecto al valor de las hembras del mismo grupo. H = hembras; M = machos; NTg = no transgénicos; 3xTgAD = triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Discusión

5.1. MECANISMOS DE INMUNOSENESCENCIA Y LONGEVIDAD.

5.1.1. Envejecimiento cronológico: Caracterización de ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico.

5.1.1.1. Cambios con la edad en las poblaciones, la funcionalidad y el estrés oxidativo e inflamatorio, así como en la activación del factor de transcripción NF κ B, en los leucocitos peritoneales a lo largo del envejecimiento, en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.

Los resultados del presente subobjetivo demuestran que las células inmunitarias peritoneales de los sujetos que disfrutaron de una longevidad excepcional preservan en general su función en respuesta a estímulos, y muestran un estrés oxidativo-inflamatorio así como una activación del NF κ B controlados en condiciones de reposo, de forma similar a los individuos de edad adulta. Los animales viejos y muy viejos presentan un deterioro de la función inmunitaria junto con una mayor oxidación/inflamación, y de ellos sólo los individuos con una activación controlada del NF κ B en sus leucocitos alcanzaron la edad longeva, lo que apoya aún más el papel crucial que este factor de transcripción juega en el envejecimiento del sistema inmunológico.

La disregulación y el deterioro generales que sufre la **respuesta inmunitaria** a medida que se avanza en el proceso de envejecimiento quedan evidenciados a través del mayor riesgo y severidad de las infecciones, así como la mayor susceptibilidad al cáncer, en los sujetos de edad avanzada (Miller, 1996; Castle, 2000).

Las alteraciones en la inmunidad asociadas a la edad han sido ampliamente estudiadas y se considera que las **células T** son los tipos de células inmunitarias más sensibles a la inmunosenescencia (Miller, 1996; Castle, 2000; Pawelec et al., 2002). En lo que respecta a la inmunidad celular, se ha descrito que la capacidad de **respuesta proliferativa** de los linfocitos ante antígenos o mitógenos, tales como la **concanavalina A**, que es estímulo para las células T, disminuye con la edad, lo que coincide con el declive del factor de crecimiento autocrino de células T, la **IL-2** (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008b). Resultados similares han sido obtenidos en la presente tesis. En este sentido, existen estudios longitudinales llevados a cabo en personas mayores que han definido un fenotipo inmunitario de riesgo en humanos, que es predictor de

supervivencia significativamente disminuida, e incluye inversión de la relación de células **CD4/CD8** a favor de las células T CD8 efectoras, y baja linfoproliferación en respuesta a mitógenos (Wikby et al., 2005; De la Rosa et al., 2006). Es más, se ha observado que los linfocitos de viejos presentan una menor **expresión de receptores para IL-2**, y una erosión telomérica que limita las divisiones celulares (Ginaldi et al., 1999b; Lord et al., 2002). También, la menor producción de IL-2 con el envejecimiento se ha relacionado con una alteración de las **respuestas** de las células T CD4 durante la infección hacia un **perfil Th2** (Cakman et al., 1996; Ginaldi et al., 1999a). Sin embargo, los presentes resultados muestran que los animales **longevos** preservan unos niveles adecuados de proliferación en respuesta a ConA, similares a los observados en adultos maduros, mientras que los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de esos mismos cultivos así como la expresión del antígeno de diferenciación leucocitaria CD25, que forma parte del receptor de dicha citoquina, encontrados en longevos son incluso superiores a los que presentan aquéllos. Esto sugiere que, a pesar de la inversión que se produce con el envejecimiento en el cociente CD4/CD8, mostrada en el presente trabajo a través de la tendencia al aumento en células T CD8 con la edad, incluyendo a los animales longevos, en los linfocitos de estos animales se podría estar dando lugar a mecanismos compensatorios exitosos, entre los que se incluiría un aumento de la inducción Th1 en respuesta a estímulos de las células T (aumento de IL-2 en respuesta a ConA y mayor cantidad de células que expresan CD25 para responder ante ella), que es capaz de reproducir, llegado el momento, los niveles adecuados de respuesta proliferativa de los adultos. En efecto, una función linfoproliferativa inducida por ConA bien conservada es uno de los biomarcadores inmunitarios que constituyen el fenotipo inmunológico que conduce a mejor salud y mayor supervivencia, en humano (De la Rosa et al., 2006). Sin embargo, también se ha sugerido que un mejor mantenimiento del cociente CD4/CD8 formaría parte de este fenotipo (De la Rosa et al., 2006), si bien no sería fundamental, al menos en lo que a los linfocitos peritoneales se refiere, según nuestros resultados. No obstante, en este aspecto, en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos no estimulados de animales longevos se observa un aumento no sólo en los niveles de IL-2, que como ya se ha comentado es un factor de crecimiento de carácter Th1, sino también en los de **IL-9**, de carácter Th2 (Renauld et al., 1990; Mosmann y Sad, 1996), en comparación con los adultos maduros. La IL-2 y la IL-9 potenciarían un ambiente propicio para los linfocitos T CD4, con objeto probablemente de revertir el entorno CD4/CD8. Estos hechos no suceden en los animales viejos. En conjunto, parece por tanto que la

funcionalidad de las células T se mantiene en los longevos, mientras que se ve fuertemente deteriorada en los viejos.

El presente trabajo indica que la **capacidad linfoproliferativa en respuesta a LPS** también disminuye con la edad, mientras que los animales longevos muestran mayor respuesta que los viejos y muy viejos pero menor que la de los adultos maduros, lo que concuerda con trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Puerto et al., 2005). De manera interesante, algunos autores han descrito que la capacidad proliferativa de las **células B** en individuos de edad avanzada puede recuperarse mediante el tratamiento con concentraciones aumentadas de **IL-2** (Whisler et al., 1991), mientras que los presentes resultados muestran que no existen cambios a lo largo de la edad en los niveles de esta citoquina en presencia de LPS. Por otro lado, además de una menor capacidad proliferativa de las células B a lo largo del envejecimiento (Whisler et al., 1991; Frasca et al., 2003), algunos autores han descrito **alteraciones en el número** de estas células, de forma que la combinación de la mencionada inversión en el cociente CD4/CD8 junto con unos niveles bajos de células B CD19+ sería un buen predictor de mayor morbilidad y mortalidad en personas mayores, formando parte del fenotipo inmunitario de riesgo (De Martinis et al., 2006). No obstante, los presentes resultados no mostraron cambios en el porcentaje de células B en el peritoneo de los ratones a lo largo de la edad, mientras que, como se indicó con anterioridad, la proliferación en respuesta a LPS sí que se vio deteriorada en viejos y muy viejos, y también, aunque en menor medida, en longevos con respecto a los adultos maduros. Según esto, si bien los cambios en el número de células B podrían producirse de manera más temprana a la etapa adulta madura (control de edad empleado en el presente trabajo), el deterioro funcional progresivo de las mismas a lo largo de la edad tendría más relevancia sobre el proceso de inmunosenescencia. Por tanto, la funcionalidad de las células B parece verse afectada tanto en viejos como en longevos.

También hay que considerar que la **activación de las células T por LPS** requiere contactos celulares con células presentadoras de antígeno viables, fundamentalmente **macrófagos** y **células dendríticas** en el peritoneo, cuya capacidad para inducir proliferación de células T se encuentra disminuida en humanos y ratones de edad avanzada (Stout y Suttles, 2005; De la Rosa et al., 2006; Solana et al., 2006). Por el contrario, una presentación de antígeno bien conservada es predictor de salud y supervivencia, y constituye parte integrante del fenotipo de no riesgo extraído de estudios longitudinales en humanos octogenarios y nonagenarios (De la Rosa et al., 2006). En este sentido, es

interesante observar en los presentes resultados la tendencia hacia mayor porcentaje de macrófagos en el peritoneo de longevos con respecto a los adultos maduros, y una cantidad relativa de células dendríticas similar en ambas edades, que fue menor en los viejos. Esto es, la respuesta proliferativa de los linfocitos T ante LPS podría mantenerse en los longevos y no contribuir al declive en la proliferación que se observa ante dicho estímulo. Sin embargo, los linfocitos T de los viejos podrían no responder adecuadamente frente al mismo.

Por lo tanto, nuestros datos se suman a otros previos que parecen apuntar a que en el envejecimiento saludable existen exitosos mecanismos compensatorios en lo que a macrófagos y células T y dendríticas se refiere. De esta manera, el deterioro de la respuesta proliferativa ante LPS en los individuos que alcanzan la longevidad extrema podría estar mostrando que las células B son las afectadas en primer lugar y de manera directa por la inmunosenescencia en los mismos, en contraste con lo que sucedería en los sujetos viejos no seleccionados, en los que, si bien las células B podrían verse alteradas, las células T serían las células de la inmunidad adaptativa cuyo deterioro funcional, dado su papel central en las respuestas inmunitarias, sería clave en el proceso de envejecimiento de estos individuos (Franceschi et al., 1995). No obstante, para responder enteramente a esta cuestión, se hacen necesarios futuros estudios que aislen y caractericen la funcionalidad de las subpoblaciones leucocitarias peritoneales específicas.

Por otra parte, datos epidemiológicos y demográficos muestran que la mayoría de cánceres se producen en pacientes mayores de 65 años, pero la incidencia y mortalidad del cáncer para la gran mayoría de sus formas aumentan a una tasa que va disminuyendo con la edad, estabilizándose alrededor de los 85-90 años, y alcanzando después dicha incidencia un tope e incluso un declive (de Rijke et al., 2000). Es más, los registros obtenidos de la autopsia de centenarios japoneses e italianos sugieren que la incidencia y la importancia del cáncer como causa de muerte disminuyen después de los 95 años (Stanta et al., 1997; Miyaishi et al., 2000). En este sentido, se han acumulado gran cantidad de artículos en la bibliografía científica que evidencian la disminución de la **actividad NK** a lo largo del proceso de envejecimiento tanto en ratones como en humanos (Puerto et al., 2005; De la Rosa et al., 2006; De la Fuente, 2008b; De la Fuente et al., 2008). No obstante, los presentes resultados muestran que los ratones longevos mantienen la actividad NK de sus leucocitos peritoneales a niveles similares a los encontrados en animales adultos, lo que concuerda con trabajos previos de nuestro grupo (Puerto et al., 2005; De la Fuente, 2008b).

Otros autores han visto que este hecho ocurre también en humano, mostrando los centenarios una actividad citotóxica preservada en relación a los adultos (Bonafè et al., 2001; 2002). De hecho, una citotoxicidad NK preservada en el envejecimiento es signo de salud y supervivencia, mientras que una actividad NK disminuida es parte del fenotipo inmunitario de riesgo y resulta en mayor morbilidad y mortalidad (De la Rosa et al., 2006). Además, dado que la actividad NK se considera como uno de los marcadores más sensibles en el análisis del desequilibrio del sistema neuro-inmuno-endocrino (Fiserová et al., 2002; Mocchegiani y Malavolta, 2004), el mantenimiento de una mejor respuesta en longevos podría contribuir al alcance de su extraordinaria longevidad en base a un mantenimiento adecuado de la comunicación neuro-inmuno-endocrina (De la Fuente, 2008b).

En el presente estudio, los animales viejos y muy viejos muestran un deterioro en la **migración de los leucocitos** hacia el foco de infección, lo que confirma trabajos previos tanto de nuestro grupo de investigación como de otros realizados en humano y en ratón (Simons y Reynolds, 1990; Fulop et al., 2004; De la Fuente, 2008b; De la Fuente et al., 2008). Sin embargo, los animales de experimentación longevos muestran una función bien preservada en los dos tipos de células inmunitarias estudiadas, linfocitos y macrófagos, hecho que ha sido descrito previamente en linfocitos y neutrófilos humanos (Alonso-Fernández, 2006; Alonso-Fernández et al., 2008). En el pasado, algunos autores no detectaron alteraciones de la quimiotaxis de las células inmunitarias con la edad, o éstas fueron insignificantes (Franceschi et al., 2000a; Lord et al., 2001). No obstante, estudios más recientes han encontrado una disminución con la edad en la señalización que se desencadena a través de receptores específicos, lo que conduce a una alteración de las funciones leucocitarias impulsadas por éstos, como es el caso de la capacidad quimiotáctica (Fulop et al., 2004). También se han encontrado alteraciones en las balsas lipídicas de las membranas celulares que podrían estar relacionadas con el mayor estrés oxidativo que afecta a las células, que se muestra en este trabajo en los leucocitos de los sujetos viejos y muy viejos, y resultarían en la alteración de la fluidez de la membrana y por consiguiente de las funciones celulares dependientes de membrana (Fulop et al., 2004; Izgüt-Uysal et al., 2004), entre las que se incluyen la quimiotaxis de los leucocitos y la fagocitosis de macrófagos. Estas dos funciones aparecen disminuidas en los sujetos viejos y muy viejos en el presente estudio.

A pesar de que en un pasado se creía que los **fagocitos** jugaban un papel menos crucial en la disfunción inmunológica que se produce en los mayores, investigaciones más

recientes apuntan al declive general en las actividades funcionales de estas células, entre las que quedan incluidas la quimiotaxis y la fagocitosis, como una razón fundamental que explica la susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones bacterianas y víricas en los ancianos, siendo éstas las causas más comunes de enfermedad y muerte en los individuos de edad avanzada (Ginaldi et al., 1999a; Lord et al., 2001; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2004a; 2005; 2008). Los estudios acerca de la **función fagocítica** en animales de experimentación longevos son prácticamente inexistentes, pero sí se ha descrito una relación entre una función fagocítica disminuida y una menor esperanza de vida en sujetos de edad avanzada y prematuramente envejecidos, tanto en ratón como en humano (Niwa et al., 1989; Guayerbas et al., 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003). En centenarios, nuestro grupo ha comprobado una preservada función fagocítica de neutrófilos (Alonso-Fernández et al., 2008). De hecho, el presente estudio pone de manifiesto que los ratones longevos preservan la capacidad fagocítica así como el estrés oxidativo-inflamatorio en las células inmunitarias, en general a niveles similares a los de los adultos maduros. Además, los longevos muestran una mayor migración de los macrófagos hacia el foco de infección en comparación con los valores encontrados en animales de menor edad y mayores que los de los adultos maduros, lo que también sucede con los niveles basales aumentados de actividad catalasa y de citoquinas como la IL-10 y la IL-13, junto con un menor porcentaje de estimulación de los niveles de ROS en leucocitos. Parece, por tanto, que una actividad catalasa basal fortalecida, potente enzima antioxidante especialmente relevante en contrarrestar el estrés oxidativo severo, junto con niveles intensificados de citoquinas que controlan la inflamación, tales como especialmente la IL-10 y otras como la IL-13, podrían ser mecanismos clave en la prevención del daño endógeno producido por el estallido respiratorio y la inflamación crónica, y conducirían a conservar las funciones leucocitarias, algunas de manera especial, como sucede con la quimiotaxis, esencial para el desarrollo de una subsecuente respuesta inmunológica adecuada en el foco de infección. Los cambios en estos parámetros podrían producirse en etapas tempranas de la vida adulta, lo que explicaría los menores niveles en el caso de la actividad catalasa y de las interleuquinas antiinflamatorias así como de la quimiotaxis de macrófagos, y los mayores niveles de ROS, encontrados en los animales adultos maduros con respecto a los longevos. No obstante, para la confirmación de estas hipótesis, se hacen necesarios futuros estudios empleando controles adultos más jóvenes.

Con respecto a los niveles de **ROS**, hay que considerar que a pesar de que su producción es un importante mecanismo para la destrucción de microorganismos patógenos, existen evidencias de correlación positiva entre niveles bajos de los mismos y mayor actividad bactericida (Boxer, 1995). De hecho, los niveles de ROS que se detectan son el resultado de la producción por parte de las células y de su utilización funcional y neutralización por parte de las defensas antioxidantes. Por otro lado, algunos autores han descrito que niveles aumentados de radicales libres no presentan un efecto paralelo sobre la función bactericida (Wolach et al., 2000), mientras que podrían resultar deletéreos para los propios leucocitos y para las células que se encuentren próximas a ellos (Víctor y De la Fuente, 2003, De la Fuente, 2008b).

En efecto, es un hecho bien establecido que el proceso de envejecimiento es el resultado de un **estrés oxidativo** crónico que afecta a los organismos vivos, debido al desequilibrio entre los compuestos oxidantes y antioxidantes endógenos, a favor de los primeros. Esta oxidación progresiva conduce al daño de biomoléculas, que finalmente causa el declive de las funciones fisiológicas asociado a la edad, incluyendo el deterioro de la función inmunitaria (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008b).

En lo que respecta a las **defensas antioxidantes**, el presente trabajo muestra que los animales viejos y muy viejos presentan niveles disminuidos de GSH y de las actividades glutathion peroxidasa y catalasa en sus leucocitos peritoneales en condiciones de reposo en relación a los sujetos más jóvenes. Por el contrario, los ratones longevos tienen unos niveles preservados de **GSH** y de actividad **glutathion peroxidasa**. Con respecto a las reservas intracelulares de GSH, se ha demostrado previamente que la depleción, incluso moderada, de las mismas, tiene dramáticas consecuencias para una variedad de funciones leucocitarias, siendo altamente sensibles aquéllas que dependen de IL-2, tales como la proliferación de los linfocitos T y la actividad NK (Dröge et al., 1994). Varios estudios demuestran niveles disminuidos de GSH y glutathion peroxidasa en ratones y humanos de edades avanzadas (Alvarado et al., 2006a; Hernanz et al., 2000; Dröge, 2005). Es más, los niveles de GSH y glutathion peroxidasa, así como la actividad de la misma, son más altos en las mitocondrias procedentes de ratas hembras que en las de machos, lo que podría ser provocado por los estrógenos y resultar en la mayor esperanza de vida de las hembras (Borrás et al., 2003). Por su parte, los leucocitos peritoneales de longevos tienen una actividad **catalasa** aumentada cuando se comparan con los adultos maduros, lo cual sugiere un papel clave de la actividad de esta enzima antioxidante para alcanzar una mayor

longevidad. En este sentido, datos previos de nuestro grupo de investigación muestran un deterioro de la actividad catalasa en los leucocitos de ratones jóvenes prematuramente envejecidos, lo que respalda el declive de este parámetro como un marcador biológico temprano de envejecimiento del sistema inmunitario (Alvarado et al., 2006b). Además, en modelos de ratones transgénicos que presentan una actividad catalasa aumentada, se ha visto que este aumento es capaz de retrasar el proceso de envejecimiento en los animales y de prolongar su vida media y máxima (Cutler, 2005; Enns et al., 2008). También, otras observaciones realizadas por nuestro grupo de investigación muestran que la actividad catalasa es mayor en los leucocitos de personas centenarias que en los procedentes de adultos de 25-35 años (Alonso-Fernández, 2006; Alonso-Fernández et al., 2008).

En el presente estudio, la disminución en las defensas antioxidantes de los leucocitos de sujetos viejos y muy viejos en comparación con los adultos es coincidente con el aumento en **marcadores de oxidación**, en términos de niveles incrementados del contenido en **glutation oxidado** y de la actividad basal de la **xantina oxidasa**, enzima que puede actuar como NADH oxidasa y participa en el estallido respiratorio. Esto último sugiere una reactividad en reposo aumentada de los leucocitos procedentes de sujetos viejos. Se ha visto previamente que los leucocitos de ratones viejos presentan niveles aumentados de glutatión oxidado (Alvarado et al., 2006a), lo que está de acuerdo con los presentes resultados. También se ha descrito un incremento en la actividad xantina oxidasa asociado a la edad en plasma de humano y de rata, y en otras localizaciones (Aranda et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio se muestra que los animales que envejecen saludablemente y alcanzan la edad longeva presentan valores similares a los de adultos maduros, tanto en el glutatión oxidado como en la actividad xantina oxidasa basal de sus leucocitos.

En suma, los sujetos longevos muestran un estado redox bien conservado, en cuanto a ambos, defensas antioxidantes y compuestos oxidantes, se refiere, en sus leucocitos peritoneales, lo que podría estar relacionado con la adecuada función en respuesta a estímulo de los mismos.

Por otra parte, hay que considerar que las células inmunitarias se encuentran continuamente expuestas a determinadas cantidades de agentes patógenos potenciales para el organismo. Ello podría dar lugar a la generación de un estado crónico de **inflamación** en bajo grado, a través del cual estas células contribuirían a acelerar el proceso de envejecimiento (Toussaint y Remacle, 1996). De hecho, se ha propuesto la presencia de un

estado de oxidación-inflamación, en el que participan las células inmunitarias, como la base de una mayor tasa de envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009).

En efecto, el presente trabajo muestra que la **carga basal de** la gran mayoría de **citoquinas proinflamatorias** estudiadas, entre las que se encuentran algunas especialmente potentes como es el caso del TNF- α , pero también otras como IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12 p70 e IFN- γ , en cultivos de leucocitos no estimulados procedentes de animales viejos o muy viejos se encuentra aumentada con respecto a los adultos maduros. Sin embargo, los longevos presentan niveles conservados de todas ellas en relación a la edad adulta. La IL-12 p40 es la excepción, dado que se encuentra aumentada en longevos con respecto a los adultos maduros, mostrando los viejos niveles similares a éstos. No obstante, la relevancia biológica de este hecho puede ser bastante limitada dado que se trata del receptor soluble, cuyo heterodímero activo muestra justamente el patrón contrario a lo largo de la edad.

En estudios realizados en humano, se ha observado que una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias que da lugar a un aumento de los niveles basales circulantes de estos marcadores proinflamatorios, tales como el TNF- α , se acompaña de fragilidad y discapacidad en personas mayores y está asociado a demencia, invalidez funcional y alto riesgo de mortalidad (De Martinis et al., 2006). En otro estudio sobre 129 pacientes de una residencia de ancianos, niveles séricos detectables de TNF- α se asociaron a fallecimiento en un periodo inferior a 13 meses (Mooradian et al., 1991). Además, el TNF- α se ha vinculado con enfermedades como el Alzheimer y la cardiopatía isquémica (Franceschi et al., 2001; De Martinis et al., 2006).

Las citoquinas proinflamatorias, especialmente el TNF- α , determinan la potencia, efectividad y duración de las respuestas inflamatorias, mientras que **citoquinas antiinflamatorias** como la IL-10 juegan un papel opuesto, restringiendo y poniendo fin a la inflamación (Lio et al., 2003). Esto lleva a pensar que unos niveles basales elevados de citoquinas proinflamatorias podrían ser perjudiciales, mientras que unos niveles basales altos de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 podrían tener efectos beneficiosos. En este sentido, se ha visto que los polimorfismos genéticos localizados dentro de los promotores de citoquinas proinflamatorias pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades asociadas al envejecimiento, a través del aumento en la transcripción génica y por consiguiente en la producción de dichas citoquinas; mientras que las variaciones genéticas que determinan producción de citoquinas antiinflamatorias o menor producción

de citoquinas proinflamatorias se han asociado con envejecimiento exitoso (Lio et al., 2003; De Martinis et al., 2006). En concreto, genotipos asociados a una elevada producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β han sido asociados con menor supervivencia en hombres (Cederholm et al., 2007). Por su parte, estudios en centenarios italianos han mostrado una relación negativa entre el genotipo GG, que da lugar a altos niveles de IL-6, y la longevidad, de modo que los hombres con dicho genotipo presentan la mitad de probabilidad de alcanzar la longevidad extrema que los que los heterocigotos GC o que los homocigotos CC, que producen menos IL-6 (Di Bona et al., 2009). También, en un estudio realizado sobre 190 centenarios italianos, se demostró que el polimorfismo IL-10 – 1082/G es un marcador específico de longevidad (Lio et al., 2002). Los autores de dicho trabajo argumentaron que este genotipo, asociado con la producción de altos niveles de IL-10, confiere un estatus antiinflamatorio al individuo, que eleva la posibilidad de alcanzar una longevidad extrema. Es más, se ha observado que el genotipo IL-10 – 1082/G es mucho menos frecuente en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer (De Martinis et al., 2006). En efecto, los resultados de la presente tesis muestran unos niveles basales disminuidos de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos en reposo procedentes de animales viejos en relación a la edad adulta madura, mientras que dichos niveles son más elevados en individuos longevos con respecto a éstos, lo que confirma el papel crucial que juega esta citoquina para alcanzar la longevidad.

Es interesante observar en los presentes resultados cómo los niveles de **citoquinas proinflamatorias**, tales como los de TNF- α o IL-6, en cultivos de leucocitos peritoneales estimulados con **LPS** presentan un patrón opuesto a la condición basal a lo largo del envejecimiento, encontrándose en animales viejos por debajo de los observados en adultos maduros. En estudios realizados en humano, algunos autores han descrito previamente que aquellos individuos que a la edad de 85 años producen niveles bajos de TNF- α en respuesta a LPS tienen 2 veces más riesgo de mortalidad general en comparación con los que producen niveles más elevados de dicha citoquina (van den Biggelaard et al., 2004). Es más, el presente trabajo muestra que los niveles inducidos por LPS de estas citoquinas en longevos son similares a los detectados en adultos maduros. Por tanto, podría deducirse que la situación de inflamación crónica en bajo grado que se produce en los leucocitos peritoneales procedentes de sujetos viejos lleva a una respuesta inadecuada cuando la inflamación es realmente necesaria para combatir una infección. En este aspecto, se ha observado, por ejemplo, que una concentración baja pero adecuada de TNF- α activa las

respuestas de los fagocitos ante bacterias y retrasa la apoptosis de estas células para permitir el desarrollo de su función, mientras que el TNF- α a altas concentraciones aumenta la apoptosis de las mismas (Lord et al., 2001). La exposición crónica a citoquinas proinflamatorias, a pesar de ser en grado bajo, podría tener a largo plazo efectos deletéreos similares sobre las células inmunitarias que los encontrados ante una exposición aguda a alta concentración, como sucede con muchos mediadores de comunicación intercelular. Recientemente, otros autores han descrito que los macrófagos de ratones envejecidos producen menos TNF- α tras la estimulación con LPS que los macrófagos de ratones jóvenes (Boehmer et al., 2005). Además, como se comentó previamente, la inversión en el cociente CD4/CD8 a favor de las células T CD8 y el sesgo de las respuestas de las células T CD4 durante la infección hacia un perfil Th2, parecen ser hechos bien establecidos que se producen con la edad, siendo el TNF- α y la IL-6 citoquinas Th1 (Lord et al., 2001). Según los presentes resultados, esto podría estar también relacionado con los menores niveles de IL-17 en viejos, dado que esta citoquina, producida por las células T CD4 memoria (Janeway et al., 2001a), media las respuestas inflamatorias a través de la inducción de citoquinas como TNF- α e IL-6 (Aggarwal y Gurney, 2002). Es más, la IL-6 puede convertir a las células Treg en células proinflamatorias productoras de IL-17 (Horwitz et al., 2008), y este ciclo se encontraría deteriorado en la vejez. No obstante, en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación en la cepa de ratón BALB/c, se observó que los niveles de TNF- α estimulados por LPS en los sobrenadantes de leucocitos peritoneales cultivados en condiciones similares a las empleadas en el presente estudio, se encontraban aumentados en ratones de 72 semanas de edad con respecto a los presentes en sujetos de 24 y 128 semanas, mostrando éstos niveles similares (Puerto et al., 2005). Esto sugiere un complejo remodelado del sistema inmunológico a lo largo del envejecimiento, que podría dar lugar a procesos multifásicos en un intento del organismo por adaptarse a los cambios y recuperar la homeostasis, y enfatiza la importancia de considerar la edad exacta de los individuos en los estudios que se centran en el sistema inmunitario.

Otra citoquina Th1, también producida por las células NK (Boehm et al., 1997), es el IFN- γ , y sus valores aparecen también disminuidos en respuesta a LPS en viejos con respecto a los adultos; hecho que se repite en la literatura científica en respuesta a distintos estímulos, a pesar de no encontrarse totalmente consensuado (Gardner y Murasko, 2002).

No obstante llama la atención en los presentes resultados que los niveles de otras citoquinas proinflamatorias inducidos por LPS, tales como IL-1 α e IL-1 β , producidas casi

en exclusividad por monocitos-macrófagos en respuesta a la infección (Dinarelli, 1997), se encuentran aumentados en viejos o muy viejos con respecto a los adultos. De esta forma, el aumento en IL-1 α e IL-1 β podría suponer un mecanismo de compensación por parte de los monocitos-macrófagos en un intento sin éxito de activar la respuesta Th1 ante la infección, que sin embargo podría contribuir a empeorar las circunstancias. El aumento en IL-1 α coincide además con el incremento en muy viejos de los niveles de VEGF, factor de crecimiento producido por estas mismas células que intensifica su activación (Ramos et al., 1998). De este modo, se podría dar lugar a un círculo vicioso difícil de interceptar, a través del cual se podrían también dañar las células vecinas, incluyendo a los linfocitos. De manera interesante, estos resultados son congruentes con la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento recientemente sugerida, que propone un papel central para el exceso de activación de los macrófagos en dicha oxidación-inflamación, acelerando el proceso de inmunosenescencia y el envejecimiento del organismo (De la Fuente y Miquel, 2009).

Por otra parte, como ya se indicó con anterioridad, los longevos presentan los niveles inducidos por LPS de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas bien conservados y similares a los de los adultos maduros. De nuevo, la excepción la supone la ya mencionada IL-12 p40, cuyos valores no variaron dentro de un mismo grupo de edad en presencia o ausencia de estímulo, y cuyo significado fisiológico es de importancia bastante relativa.

Cuando la respuesta de **citoquinas proinflamatorias** se inicia mediante el estímulo de los linfocitos T a través de la incubación con **ConA**, se observa un patrón similar al observado cuando el estímulo es LPS, con ciertas peculiaridades. De nuevo, existe una respuesta disminuida de TNF- α , IL-6 e IFN- γ en viejos con respecto a la edad adulta, mostrando los longevos valores similares a éstos. Además, en adultos y longevos se intensifican los niveles de estas citoquinas producidas principalmente por linfocitos Th1, entre las que se incluye también la IL-3, pero no así en viejos, de manera que sus niveles aparecen disminuidos en éstos. La disminución en los niveles de IL-3 con la edad en respuesta a ConA ha sido descrita con anterioridad en linfocitos aislados de bazo (Cai et al., 1990). Así, los linfocitos de viejos parecen tener menor capacidad para inducir la maduración y polarización de las células dendríticas hacia DC1 productoras de IL-12p70, que podría llevar a los menores niveles de IL-1 producidos por estas mismas células y los monocitos-macrófagos, y todo ello contribuir a su vez en la baja respuesta Th1. Otros

autores han descrito con anterioridad niveles disminuidos de IL-12p70 en esplenocitos procedentes de ratones viejos estimulados con ConA (Park et al., 2008). Sin embargo, los muy viejos presentan un aumento en IL-1 α e IL-1 β en respuesta a este mitógeno con respecto a los adultos, de manera similar a lo que sucedía ante LPS, lo que demuestra el complejo remodelado que sufre el sistema inmunitario a lo largo del envejecimiento, dando lugar en efecto a procesos multifásicos en un intento del organismo por adaptarse a los cambios y recuperar la homeostasis.

Por su parte, los sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales de longevos muestran niveles conservados de toda la red de citoquinas proinflamatorias en respuesta a ConA. Otro signo de la alta competencia de las células T en longevos lo encontramos en los niveles aumentados de GM-CSF inducidos por dicho mitógeno en relación a los adultos maduros. Hay que considerar que este factor de crecimiento es producido por muchos tipos celulares, entre los que se encuentran los macrófagos pero también los linfocitos T (Lee et al., 1985). En el contexto que nos ocupa, el GM-CSF forma parte de la respuesta inflamatoria, de manera que la activación de un pequeño número de macrófagos puede conducir rápidamente a un aumento en su número, lo que podría ser crucial para combatir la infección mediante la destrucción de los microorganismos patógenos por parte de los mismos. La disminución en los niveles de GM-CSF estimulados por ConA podría producirse de manera más temprana a la etapa adulta madura, control empleado en el presente estudio. De este modo, los longevos no sólo presentan una respuesta funcional bien conservada ante la infección, sino que llegado el momento podrían contar con un mayor número de células para hacer frente a la misma.

También, es interesante observar el perfil de **citoquinas antiinflamatorias** en respuesta a **LPS** y **ConA** con la edad. Los niveles de IL-4 e IL-10 en respuesta al primero, y los de IL-10 e IL-13 inducidos por el segundo, disminuyen en viejos con respecto a los adultos. Estos resultados demuestran que el sesgo que se produce con el envejecimiento en las respuestas de las células T CD4 durante la infección hacia el perfil Th2 no se debe a una disminución y aumento absolutos del perfil Th1 y Th2, respectivamente, sino que ambos tipos de respuestas se encuentran deterioradas, resultando finalmente en un aumento relativo de la respuesta Th2. Este hecho queda constatado mediante la disminución en muy viejos, con respecto a los adultos, de los niveles de factores de crecimiento como la IL-5 y la IL-2, previamente comentada, procedentes de células T activadas, Th2 y Th1 respectivamente (Azuma et al., 1986). Por su parte, los longevos mantienen unos valores

preservados de IL-4 e IL-10 inducidos por ambos tipos de estímulos en relación a los adultos, mientras que los de IL-13 aparecen aumentados con respecto a éstos. Podríamos encontrarnos aquí ante un marcador temprano de envejecimiento del sistema inmunitario, no sólo en estado basal sino también en respuesta a estímulo, y dado que se trata de una citoquina producida casi en exclusividad por las células T activadas (Cameron y Kelvin, 2003), constataría la importancia de estas células en la inmunosenescencia de los sujetos viejos no seleccionados, en contraste con lo que sucede en los individuos longevos (Franceschi et al., 1995).

Por otra parte, los cambios a lo largo de la edad en los niveles de las **quimioquinas** estudiadas en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos peritoneales basales y estimulados con LPS y ConA, parecen tener menor relevancia para alcanzar la longevidad extrema, dado que tanto las procedentes principalmente de macrófagos, tales como KC, MCP-1 y MIP-1 β (Ohmori y Hamilton, 1994; Janeway et al., 2001b), como las derivadas de células T, como es el caso de RANTES (Janeway et al., 2001b), sufren un declive con la edad en unas u otras circunstancias; declive que se observa también en los individuos que han alcanzado una longevidad extraordinaria. Esto apoya la idea de que los longevos serían aquellos individuos con mayor capacidad de adaptación a los cambios que irremediabilmente se producen con el tiempo y de recuperación por tanto de la homeostasis, puesto que, como ya se ha comentado, la capacidad quimiotáctica de los leucocitos peritoneales de los ratones longevos se encuentra bien conservada.

Es importante hacer hincapié sobre otro hecho de indudable interés observado en los presentes resultados, que muestran que la activación del factor de transcripción **NF κ B** en los extractos nucleares de leucocitos peritoneales en reposo presenta el mismo perfil que los niveles de TNF- α en los cultivos basales de dichas células, aumentando en los individuos viejos y muy viejos en comparación con los adultos maduros y encontrándose en éstos y en longevos a niveles similares. En más, en los grupos de ratones viejos y muy viejos, los sujetos que alcanzaron longevidad extrema fueron sólo aquéllos en los que se observó una activación basal controlada del NF κ B en sus leucocitos, lo que apoya aún más el papel clave que juega este factor de transcripción en la inmunosenescencia y en el envejecimiento del organismo. El NF κ B es un factor de transcripción ubicuo que se sabe es activado por citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α y por condiciones oxidativas, dos hechos presentes en los animales viejos y muy viejos estudiados en este trabajo. La activación del NF κ B induce la expresión de una variedad de genes que codifican moléculas

implicadas en la respuesta inmunitaria e inflamatoria tales como citoquinas y proteínas proinflamatorias, y moléculas de adhesión, conduciendo consecuentemente a un aumento en el estrés inflamatorio y oxidativo si no se controla adecuadamente (Dröge, 2002a; De la Fuente, 2008b). Como se ha mencionado anteriormente, el TNF- α y citoquinas relacionadas pueden inducir efectos opuestos tales como la activación y proliferación celular o la muerte de las células, y esto podrían realizarlo de manera importante mediante el control de la ruta del factor NF κ B (Liang et al., 2004). Otro hecho que apoya esta dualidad del NF κ B es que la completa depleción de su ruta evita la regulación a la alta de la expresión de enzimas antioxidantes por estrógeno en la línea celular mamaria humana MCF 7 en reposo (Viña et al., 2005; 2008). Por tanto, la activación del NF κ B debe encontrarse bajo un control exhaustivo dado que los niveles adecuados de activación de esta ruta, tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos, son esenciales para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular y el consecuente desarrollo de una respuesta inmunitaria apropiada. Sin embargo, una activación del NF κ B alta de manera persistente podría ser deletérea y, de hecho, se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades asociadas al envejecimiento, como por ejemplo la aterosclerosis (Ginn-Pease y Whisler, 1998), y también con muchos procesos de inflamación crónica, incluyendo la esclerosis múltiple (Merrill y Beveniste, 1996; Barnes y Karin, 1997). Es más, una activación del NF κ B excesiva se ha relacionado con un aumento de la mortalidad en modelos de shock endotóxico letal agudo (Víctor y De la Fuente, 2003). También, en esos mismos modelos se observó que el NF κ B era regulado a la baja por precursores del glutatión, que de esta forma eran capaces de prevenir de la oxidación y la inflamación excesivas (Víctor y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003a). En lo que respecta al envejecimiento, varios autores han observado que diferentes tejidos procedentes de roedores viejos, como corazón, hígado, riñón y cerebro, expresan mayores niveles de actividad de unión del NF κ B que los tejidos de roedores adultos jóvenes (Helenius et al., 1996; Ginn-Pease y Whisler, 1998). Por el contrario, en otro estudio realizado en linfocitos T humanos se observó una disminución con la edad en la inducción de actividad de NF κ B en respuesta a estímulos propios de los mismos (Trebilcock y Ponnappan, 1996). Se ha descrito que las rutas sensibles al estado redox que desencadenan la activación del NF κ B son bastante diferentes dependiendo del tipo celular que se considere, lo que dificulta el desarrollo de modelos consensuados (Gloire et al., 2006). Sin embargo, parece probable que la activación crónica persistente de la ruta del NF κ B en los leucocitos en reposo podría conducir a la

desregulación de la vía y a la falta de respuesta ante la infección. Es más, se ha descrito que los estrógenos previenen de la inflamación excesiva en modelos de agresión grave tales como isquemia cerebral o endotoxemia a través de la atenuación de la vía del NF κ B, mientras que los animales viejos muestran una activación mucho más elevada (Wen et al., 2004; Park et al., 2006; Sunday et al., 2006; 2007). Esto sugiere un panorama mucho más complejo de lo que podría pensarse en principio, en el cual los animales viejos necesitarían una señal mucho mayor para activar la ruta del NF κ B a la hora de responder a estímulos, pero una vez que se ha provocado el inicio de la misma, se produciría una respuesta descontrolada y excesiva que daría lugar a un aumento del daño. También podría llevar a pensar que la presencia de estímulos, incluso en bajo nivel, en localizaciones específicas tales como sangre, cerebro u otros órganos internos, que deben encontrarse en condiciones asépticas en situación normal, daría lugar a esta respuesta descontrolada en los individuos viejos. Por tanto, se hacen necesarios futuros estudios enfocados a conocer la activación del NF κ B en leucocitos peritoneales y sanguíneos en reposo y estimulados tanto a lo largo del envejecimiento como en los individuos que han alcanzado la longevidad extrema.

Por otra parte, Rensaw et al. (2002) mostraron que la estimulación con LPS de macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato resulta en una menor secreción de TNF- α e IL-6 cuando éstos proceden de ratones viejos en relación a los valores obtenidos en jóvenes, en acuerdo con los presentes resultados. En ese mismo estudio, los autores sugirieron que los menores niveles de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS en viejos podrían ser resultado, al menos en parte, de la menor expresión de **TLR-4** en los macrófagos de esos animales. En efecto, el TLR-4 es esencial para el desarrollo efectivo de la respuesta inmunitaria frente al LPS de las bacterias Gram-negativas, y junto con el **TLR-2**, constituye el principal receptor para el reconocimiento de una variedad de componentes de las paredes celulares bacterianas (Hirschfeld et al., 2000). Según los resultados del presente trabajo, si bien los adultos maduros muestran similar expresión de TLR-4 en las membranas de sus macrófagos que los viejos, los longevos tienen valores aumentados con respecto a aquéllos, lo que podría ser indicativo de que la disminución a la que se refieren Rensaw et al. (2002) se produce de manera temprana en el proceso de envejecimiento. No obstante, otros autores no han observado cambios en la intensidad de la señal para TLR-2 o TLR-4 en macrófagos esplénicos de individuos viejos de 18-20 meses de edad (comparables al grupo de viejos empleados en el presente estudio) en relación a sujetos jóvenes de 8-10 semanas de edad (Boehmer et al., 2005). En contraste, otros autores sí que

han descrito disminución del nivel de expresión en superficie de TLR-2 en macrófagos peritoneales de individuos viejos de esa misma edad al compararlos con los de animales de 8-12 semanas (Murciano et al., 2008). De nuevo, podríamos encontrarnos aquí ante el paradigma de una distinta regulación según la localización, incluso tratándose del mismo tipo celular, lo que es lógico si pensamos que en el caso concreto de los TLRs, se ha descrito que su expresión se altera muy rápidamente en respuesta a la presencia de patógenos, y también de citoquinas y factores estresantes (Akira et al., 2006), que a su vez dependen del ambiente celular, y éste también va a ser distinto según la localización. Con respecto a la expresión de TLR-2 en la superficie de los macrófagos peritoneales, en los resultados de la presente tesis se observa que los adultos maduros y los viejos muestran niveles similares, mientras que los muy viejos presentan valores aumentados con respecto a aquéllos, que son aún mayores en los longevos. Esto concuerda con la idea de una disminución temprana de este marcador con la edad. De manera interesante, en los muy viejos se podrían establecer mecanismos de compensación como éste, que si bien no son suficiente para alcanzar la edad longeva, podrían contribuir a superar la edad en la que se produce el pico de mortalidad de la población.

Otras células fundamentales para que se produzca la respuesta inmunitaria innata, que realizan el reconocimiento de patógenos fundamentalmente a través de la vía de los TLRs, son las células dendríticas. Existe un único trabajo, de publicación reciente, que describe niveles similares de expresión génica de todos los TLRs, así como de expresión de TLR-4 a nivel de proteína, en células dendríticas procedentes de humanos jóvenes y mayores (Agrawal et al., 2007). Nuestros resultados muestran que la expresión de TLR-2 y TLR-4 en la superficie de las células dendríticas no varía con la edad en ratón, y tampoco lo hace en individuos longevos. Como la maduración de las células dendríticas puede ser inducida a través de TLRs (Agrawal et al., 2007), la menor respuesta inmunitaria adaptativa que se aprecia en la vejez (y en la que participan las células dendríticas maduras) no se relacionaría con una menor expresión de sus TLRs. Sí lo podría ser con el número de dichas células dendríticas, que como se ha comprobado en la presente tesis, es menor en viejos que en longevos.

Además de en las células del sistema inmunológico innato ya mencionadas y en otras como las NK (Eriksson et al., 2006), se ha encontrado expresión de TLRs en células del sistema inmunitario adaptativo, tales como linfocitos B (Gerondakis et al., 2007) y células T reguladoras (Sutmoller et al., 2007). Este hecho, unido a su capacidad de unión a

diversos ligandos endógenos (Pandey y Agrawal, 2006), implica que al contrario de lo que se pensaba hace no demasiados años, los TLRs median una amplia variedad de funciones. Así, por ejemplo, algunos autores han descrito que la unión del TLR-4 a sus ligandos controla y coordina la división y la supervivencia de las células B a través de la vía del NF κ B (Gerondakis et al., 2007), cuya correcta modulación es fundamental en el desarrollo de una respuesta inmunitaria óptima y en el alcance de la longevidad, según los resultados de la presente tesis. Por otra parte, entre los ligandos endógenos del TLR-4 se encuentran las lipoproteínas oxidadas de baja densidad y el péptido A β , cuya acumulación en cerebro es clave en la enfermedad de Alzheimer (Fassbender et al., 2004; Mullick et al., 2006). Además, en los últimos años se ha acumulado abundante evidencia que sugiere que el cerebro puede no ser el lugar inmunológicamente privilegiado que se consideró en el pasado. En la actualidad, se acepta que los linfocitos T circulantes son capaces de penetrar en pequeñas cantidades y realizar sus funciones en el parénquima de un cerebro normal. Algunos autores han sugerido que esto sucede también con las células B (Anthony et al., 2003). Es interesante observar en los presentes resultados, que tanto el TLR-2 como el TLR-4 se encuentran aumentados en las células CD4 y el TLR-2 en las células CD8 de muy viejos con respecto a los adultos maduros, mostrando los longevos valores similares a éstos. Sin embargo, en las células CD19, la expresión en superficie de ambos receptores aparece muy intensificada en los longevos con respecto a edades más jóvenes. Es difícil predecir el significado biológico de estos resultados, especialmente si se tiene en cuenta que los TLRs en distintos tipos celulares han sido asociados a procesos tan dispares como neuroprotección y neuroinflamación (Walter et al., 2007; Okun et al., 2009), y al desarrollo de otros procesos inflamatorios crónicos así como a su prevención (Gomariz et al., 2005; 2007; Suttmüller et al., 2007). Sin embargo, dado el papel clave de los linfocitos T en procesos inflamatorios crónicos tanto dentro como fuera del sistema nervioso central (Arumugam et al., 2005; Cohen Tervaert, 2009), es tentativo pensar que la alteración funcional de estas células mediante la unión de los TLRs aumentados a ligandos endógenos podría contribuir, al menos en parte, al desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento y a la morbilidad y mortalidad aceleradas en los muy viejos en relación a los longevos. Si esto es así, el aumento de TLRs en las células B de los longevos podría estar relacionado con su menor capacidad proliferativa, y apoyaría la hipótesis de que estas células podrían ser las afectadas en primer lugar por la inmunosenescencia en los individuos que alcanzan la longevidad extrema, en contraste con lo que sucede en los sujetos viejos no

seleccionados (Franceschi et al., 1995). Por otra parte, parece que no existen cambios a lo largo de la edad en la expresión de superficie de TLR-2 y TLR-4 en el conjunto de células CD25, no obstante, se hacen necesarios futuros estudios que diferencien la expresión de los mismos en otras subpoblaciones celulares que presentan este marcador, además de las ya valoradas, como las células NK y los linfocitos T reguladores, que ayuden a extraer una conclusión más detallada de este resultado.

Tampoco se observó un efecto de la edad en la **apoptosis** de los leucocitos peritoneales, parámetro sobre el cual se han descrito cambios contradictorios a lo largo del envejecimiento. Este resultado sugiere que a pesar de que las células se encuentran más dañadas en viejos, tendrían la misma capacidad de supervivencia que las de individuos más jóvenes, pudiendo contribuir así a intensificar el daño en las células y tejidos vecinos. No obstante, serían muy necesarios futuros estudios que confirmen estos resultados mediante técnicas más sensibles a la empleada en el presente trabajo, como aquéllas basadas en citometría de flujo.

En **conclusión**, el presente trabajo confirma que los individuos que envejecen saludablemente, llegando a alcanzar la edad longeva, serían aquéllos con mejor capacidad para adaptarse y hacer frente a los factores estresantes del sistema inmunológico a lo largo de la vida (Franceschi et al., 2000b), y apunta a que una activación controlada del factor de transcripción NF κ B en los leucocitos en reposo podría contribuir de forma crucial al mantenimiento de un ambiente basal reductor y antiinflamatorio, que permitiría una respuesta a estímulos bien conservada por parte de las células inmunitarias, conduciendo a un aumento de la longevidad. Los datos obtenidos parecen corroborar la oxidación-inflamación que tiene lugar en el envejecimiento y cómo el estado del sistema inmunitario puede contribuir a acelerar o retardar el proceso de envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009).

5.1.1.2. Neuroimagen por resonancia magnética en ratones hembras ICR/CD1 adultos, viejos y longevos.

Una vez finalizado el estudio inmunitario a nivel peritoneal, esos mismos animales fueron sometidos a análisis de neuroimagen por resonancia magnética para conocer los posibles cambios en diversas áreas cerebrales a lo largo de la edad, con especial interés en los sujetos longevos. Por razones técnicas (algunos animales murieron con anterioridad), el

número de individuos de algunos de los grupos de edad, especialmente los de viejos y longevos, fue bastante limitado, lo que lamentablemente pudo afectar negativamente a la potencia estadística de los datos obtenidos en este estudio. No obstante, a pesar de que únicamente se han podido detectar tendencias al deterioro con la edad y no diferencias estadísticamente significativas, sí creemos interesante comentar con brevedad los resultados obtenidos. Según éstos, el declive cerebral con el envejecimiento parece originarse o producirse especialmente en zonas específicas y de manera progresiva. De las diversas áreas cerebrales estudiadas, la corteza entorrinal podría ser la más afectada, o afectarse primeramente, en los muy viejos, mientras que los longevos parecen preservar esta área con mayor integridad, mostrando no obstante mayor deterioro en la corteza somatosensorial. Esto es, en el cerebro de los animales que alcanzan la longevidad extrema también se producirían cambios morfológicos, pero las zonas en que éstos se dan parecen ser distintas con respecto a los individuos viejos no seleccionados. Así, a pesar de ser un resultado muy preliminar que deberá ser confirmado en futuros estudios aumentando el número de sujetos por grupo, es de gran interés, especialmente si se considera el hecho de que es precisamente la corteza entorrinal la zona que se ha mostrado más afectada dentro de la formación hipocampal, empleando una técnica similar a la usada en el presente trabajo, en enfermos de Alzheimer en relación a los sujetos sanos (Small et al., 2000). De este modo, los individuos de edad avanzada no seleccionados sufrirían un declive de las habilidades de memoria y una propensión a la demencia tipo Alzheimer, pero no así los sujetos longevos. En éstos, sin embargo, se afectarían primeramente las funciones de aprendizaje integradas en la corteza somatosensorial.

Las razones que podrían subyacer a estas diferencias en los cambios morfológicos que parecen producirse con la edad en viejos y en longevos nos son desconocidas. No obstante, recordemos la estrecha relación que existe entre el sistema nervioso y el inmunitario. Se ha propuesto que la inflamación crónica asociada al envejecimiento, con el exceso de activación de las respuestas proinflamatorias por parte de las células del sistema inmunitario innato periférico y los consecuentes niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias a ese mismo nivel, puede incidir sobre las células gliales y alterar su funcionalidad. El exceso de activación por parte de la glia a nivel central tiene como resultado la neuroinflamación, especialmente en áreas como el hipocampo, la cual se encuentra en la base del deterioro cognitivo con el envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al mismo, como el Alzheimer (von Bernhardi, 2007). En este

sentido, los resultados descritos por nosotros en la presente tesis y en estudios previos, así como los indicados por otros autores, demuestran que la inflamación crónica periférica basal es en efecto mayor en los individuos viejos, mientras que los individuos que alcanzan la edad longeva son aquéllos capaces de mantener un bajo estatus inflamatorio, similar al que aparece en la etapa adulta (De Martinis et al., 2005; 2006; De la Fuente y Miquel, 2009). También, es un hecho constatado que los linfocitos T y B periféricos son capaces de penetrar en pequeñas cantidades y realizar sus funciones en el parénquima de un cerebro normal. Si a esto sumamos los resultados obtenidos en la presente tesis que parecen apuntar a que, junto con ese exceso de inflamación en los individuos viejos no seleccionados, las células T serían las primeramente afectadas dentro de la inmunidad adaptativa, en contraste con lo que sucedería en los longevos, en los que serían los linfocitos B los que sufrirían primeramente los signos de la inmunosenescencia; es tentativo hipotetizar acerca de la posible contribución de la alteración con origen en unos u otros tipos celulares sobre el deterioro cerebral de las cortezas entorrinal y somatosensorial, respectivamente. Esta idea se sustenta en la demostrada contribución de las células T en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Marx et al., 1998). Además, un estudio muy reciente realizado en ratones ha apuntado ya acerca del posible impacto de la acumulación progresiva de linfocitos T a lo largo del envejecimiento normal en áreas cerebrales como el hipocampo sobre el progresivo declive cognitivo con la edad (Stichel y Luebbert, 2007). Los autores de dicho estudio localizaron las células T preferentemente en áreas perivasculares, indicativo de su reclutamiento de fuentes sistémicas, y la carga celular de las mismas fue diferente según la zona cerebral analizada, lo que sugiere que su entrada es selectiva (Stichel y Luebbert, 2007). De manera interesante, los autores indican ausencia de acumulación progresiva de células B en cerebro con el envejecimiento hasta la edad de 24 meses, comparable al grupo de edad muy vieja empleado en el presente trabajo. Si estas células juegan un papel en el envejecimiento cerebral de los longevos es de momento una incógnita. Podría ser relevante llevar a cabo futuros estudios que evalúen mediante inmunohistoquímica la presencia y estado de linfocitos T y B en distintas áreas cerebrales a lo largo de la edad y en individuos que han alcanzado la longevidad extrema.

Por último, los presentes resultados sugieren que las áreas hiperintensas en T2, que se corresponden con líquido cefalorraquídeo y son indicativas de atrofia cerebral, son más pronunciadas en los ratones de edad avanzada que en los adultos maduros, de manera similar a lo que sucede en humanos y en otras especies, como los lemures (Murphy et al.,

1992; Dhenain et al., 1997; 2000). Además, según nuestros resultados, la acumulación de líquido cefalorraquídeo se produce también en el cerebro de los longevos, lo que podría ser indicativo de que una atrofia cerebral moderada es un hecho no sólo a lo largo del envejecimiento normal, sino también en el envejecimiento saludable. Este resultado ha sido además descrito en humanos sanos de edades comprendidas entre los 66 y los 96 años (Coffey et al., 1998), pudiendo ser considerados estos últimos como individuos longevos por encontrarse próximos a la edad centenaria con un buen estado de salud. Así, las consecuencias fisiológicas de esta atrofia requieren de futuras investigaciones científicas, pero no deben de ser graves puesto que no evitan alcanzar una edad avanzada.

5.1.1.3. Profundización en el daño oxidativo inmunitario y cerebral a proteínas, así como en la susceptibilidad a la oxidación lipídica y su relación con la composición en ácidos grasos, en ratones hembras BALB/c adultos, viejos, y longevos.

El proceso de envejecimiento es resultado del desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes endógenos, a favor de los primeros (De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente y Miquel, 2009). En este contexto, la acumulación de productos finales de oxidación, tales como proteínas oxidadas, podría contribuir al declive funcional que se da con la edad. Además, el envejecimiento va acompañado de un deterioro de los sistemas fisiológicos, el nervioso y el inmunitario, así como de su comunicación bidireccional, lo que explica la pérdida de la homeostasis, y la mayor morbilidad y mortalidad en la vejez (De la Fuente, 2008b). En este contexto, es de indudable interés conocer los niveles de oxidación proteica de ambos sistemas en los individuos que han alcanzado la longevidad extrema, contribuyendo así a esclarecer las bases de la misma.

Sorprendentemente, los resultados del presente trabajo muestran niveles similares de todos los marcadores no enzimáticos de **oxidación proteica** estudiados en los animales adultos y en los longevos, tanto en cerebro como en bazo, con la excepción de AASA en las proteínas de cerebro, que se encontró disminuido en longevos al compararlos con los adultos. Si consideramos los animales viejos, en ellos todos los marcadores de oxidación proteica en cerebro se encontraron aumentados en los animales viejos con respecto a las etapas adulta y longeva, con la excepción de AASA, que fue similar para adultos y viejos, y CEL, que fue menor en viejos en comparación con los adultos y los longevos. Estos cambios fueron menos marcados en bazo, en el que a pesar de que todos los marcadores

de alteración proteica mostraron en general una tendencia al aumento en viejos, ésta sólo fue estadísticamente significativa en el caso de MDAL con respecto a adultos y longevos, y de GSA en relación a estos últimos.

Es interesante observar que los efectos de la edad sobre los niveles de MDAL no son idénticos valorados a través de *western blot* o de CG/EM, dado que el análisis *western blot* reveló mayores valores de MDAL, tanto en bazo como en cerebro, en viejos y en longevos con respecto a los adultos, y niveles similares del mismo en los dos grupos de edades más avanzadas (viejos y longevos). Estas diferencias pueden ser debidas a varias razones. En primer lugar podría reflejar el hecho de que ambas técnicas no determinan el daño a la misma población de proteínas. La CG/EM tiene más poder cuantitativo que la inmunodetección y determina las modificaciones en todas las proteínas, mientras que el *western blot* se limita a proteínas de tamaño de entre 20 y 100kDa. Además, el número de individuos valorados mediante este último fue pequeño, mucho menor que el determinado por CG/EM, por lo que los resultados del *western blot* deberían ser considerados con cautela a la hora de ser generalizados, ya que podría existir cierto sesgo en los mismos. No obstante, cuando se llevó a cabo la valoración por *western blot* del marcador CML, se observó un aumento en viejos con respecto a los adultos en un órgano de células postmitóticas como es el corazón, mostrando los longevos niveles similares a los adultos, esto es, resultados similares a los obtenidos en cerebro, también constituido fundamentalmente por células postmitóticas, con CG/EM. En el caso de los ganglios axilares, no se observaron cambios significativos con la edad en este marcador, al igual que sucede en otro órgano inmunocompetente como es el bazo utilizando CG/EM.

En vista de los presentes resultados, puede **concluirse** que los individuos longevos son altamente resistentes al daño molecular derivado de la oxidación. Esos niveles de oxidación proteica controlados en los sistemas nervioso e inmunitario podrían contribuir a una capacidad funcional más preservada, y ser por tanto un mecanismo importante para alcanzar la longevidad con un buen estado de salud. El marcador AASA podría ser un buen candidato a marcador temprano de envejecimiento, especialmente en tejidos postmitóticos altamente diferenciados, y presentar ya valores altos a la edad adulta empleada en el presente trabajo. Es éste un hecho que debería ser confirmado analizando dicho marcador en edades más jóvenes a las utilizadas en la presente tesis. Además, de todos los marcadores de oxidación proteica estudiados en cerebro y bazo, MDAL parece ser el más sensible al proceso de envejecimiento, puesto que su aumento en la vejez se produce de

forma significativa en ambos órganos. Por tanto, debería ser considerada en futuros trabajos su valoración en otros órganos, ya que podría tratarse de un marcador universal de daño en el envejecimiento.

Otra conclusión que podría extraerse del presente estudio es que la acumulación de proteínas oxidadas con el tiempo se produce más tempranamente en cerebro que en bazo, lo que es lógico si pensamos que el cerebro es un órgano de naturaleza esencialmente postmitótica. Esta idea se sustenta también con los resultados de la valoración de CML en corazón y ganglios axilares, ya que aumenta en el corazón, tejido postmitótico, pero no en los ganglios, de viejos con respecto a los adultos, mostrando los longevos niveles similares a éstos. No obstante, se hacen necesarios futuros estudios que evalúen estos marcadores de daño a proteínas en leucocitos aislados de los órganos inmunitarios, y también peritoneales y circulantes.

Es interesante el resultado obtenido con CEL en cerebro, cuyos niveles disminuyen en viejos con respecto a los adultos, mostrando los longevos valores similares a éstos. Esto podría llevar a pensar que la idea de que el control de todos los marcadores de oxidación conduce a la prolongación de la longevidad es errónea, y que por tanto, un tipo específico de daño tiene más importancia que otro en términos de envejecimiento y longevidad, como ya ha sido apuntado por algunos autores (Lambert et al., 2004). Otra posible explicación la encontramos en que los precursores de CEL son compuestos reactivos derivados de las rutas glucolíticas (Ahmed et al., 1997), de modo que un bajo nivel de CEL podría reflejar defectos bioenergéticos asociados al envejecimiento. Dado que tales deterioros energéticos son un rasgo característico de una variedad de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Calabrese et al., 2001), los resultados podrían sugerir que los individuos viejos y no los longevos presentarían el declive energético mencionado y serían susceptibles a padecer dichas enfermedades.

De hecho, de entre las posibles razones causales a que no todos los marcadores de daño proteico sigan el mismo patrón de cambio en una misma localización con el envejecimiento, se encuentra precisamente su origen relativamente diferente. Por ejemplo, el MDA, que es el producto principal de la peroxidación de ácidos grasos altamente insaturados, reacciona predominantemente *in vivo* con los residuos lisina de las proteínas (Draper et al., 2000). Por su parte, CML tiene un origen mixto en la peroxidación lipídica y en la glicoxidación (Fu et al., 1996), mientras que CEL, como ya se ha comentado, encuentra su origen principalmente en la oxidación de carbohidratos (Ahmed et al., 1997).

GSA y AASA constituyen los principales carbonilos proteicos, formados por oxidación directa de los residuos arginina el primero y de lisina el segundo (Requena et al., 2003). Se ha visto que los grupos carbonilos aumentan con la peroxidación lipídica y con el grado de insaturación de los ácidos grasos (Forsmark-Andrée et al., 1995; Refsgaard et al., 2000; Herrero et al., 2001; Pamplona et al., 2004). No obstante, el efecto de esta insaturación de los ácidos grasos sobre los carbonilos proteicos puede variar dependiendo del marcador seleccionado (Pamplona et al., 2004).

Además, es bien sabido que no todas las proteínas presentan igual susceptibilidad a la carbonilación, y estudios más recientes han mostrado que tampoco todas ellas se glucosidan ni lipoxidan igualmente (Kapphahn et al., 2006; Hamelin et al., 2007). En este sentido, las modernas técnicas de proteómica en dos dimensiones han permitido una aproximación al conocimiento de los cambios en la abundancia proteica en muestras biológicas a lo largo de la edad (Kim et al., 2007). En nuestro caso, a pesar de que por razones técnicas lamentablemente no nos fue posible la determinación de CML tras la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas de corazón y ganglios axilares, que era nuestra intención inicial, la tinción de plata sí que nos permite intuir, de forma muy preliminar, un patrón de abundancia de proteínas específico de la edad y la localización. La futura continuación de esta línea de investigación se encuentra sin duda entre nuestros objetivos prioritarios.

Como se viene comentando, los productos finales de oxidación proteica están estrechamente relacionados con la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, cuya sensibilidad a la oxidación aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso. De esta forma, los ácidos grasos altamente insaturados son las macromoléculas más susceptibles al daño oxidativo en las células (Pamplona, 2008). Ésta es la razón por la cual nos propusimos también valorar la **composición de ácidos grasos** en cerebro y bazo, así como determinar otros índices relacionados de interés, entre los que se incluyen el índice de dobles enlaces y el índice de peroxidizabilidad, que muestran una correlación negativa con la longevidad entre especies (Sanz et al., 2006; Pamplona y Barja, 2007) y también entre individuos de una misma especie (Park et al., 1996; Hulbert et al., 2006). Además, la alteración en la composición de ácidos grasos con la edad podría conducir a un deterioro de funciones *per se*, por ejemplo de aquéllas que dependen de la integridad y fluidez de membrana, así como a enfermedades asociadas al envejecimiento. Por otra parte, se ha descrito recientemente que aldehídos y

productos finales avanzados de lipoxidación son capaces de activar al factor de transcripción NF κ B en distintos tipos celulares, entre los que se incluyen leucocitos, como es el caso de los monocitos (Je et al., 2004; Shanmugam et al., 2008).

En efecto, dichos índices así como la longitud de la cadena de los ácidos grasos se encuentran disminuidos en el cerebro de los longevos con respecto a los adultos, mostrando los viejos valores similares a éstos, indicativo de que podrían tratarse de marcadores tempranos de envejecimiento en tejidos altamente diferenciados, cuyo aumento se produciría tempranamente en relación a otros marcadores y podría detectarse ya en la edad adulta que se ha utilizado en el presente estudio. Esta baja susceptibilidad lipídica a la oxidación en el cerebro de los longevos podría explicar, al menos en parte, la alta resistencia a la oxidación proteica que muestran estos individuos. No obstante, en nuestro estudio, el único marcador de daño a proteínas en cerebro que es mapeado de manera directa a través de estos índices es AASA, que también es menor en longevos en relación a adultos y viejos. Como se comentó anteriormente, en general, el resto de marcadores de oxidación proteica en este órgano se encontraron a niveles similares en adultos y longevos, y aumentados en viejos.

Si consideramos el bazo de los viejos, a pesar de que los cambios menos marcados en los niveles de daño a proteínas coinciden con una ausencia de variación en los índices de medida de la susceptibilidad a la oxidación lipídica, hay que recordar que MDAL se encuentra aumentado en esos individuos con respecto a adultos y longevos, y GSA con respecto a estos últimos.

Por tanto, parece que, en general, los cambios con la edad en los productos finales de oxidación proteica están relacionados pero no son la imagen especular de la variación en los índices de susceptibilidad a la oxidación lipídica con el envejecimiento. Un hecho similar ha sido descrito previamente por Lambert et al. (2004), y es indicativo de que otros factores, tales como los ya comentados, pero también otros, entre los que se incluyen la tasa de producción de radicales libres, la presencia/actividad de agentes protectores, como son los antioxidantes, y/o de los mecanismos de reparación de daño, cambian con la edad. Es más, cambios en ácidos grasos específicos en viejos, que no existen en longevos, y viceversa, podrían jugar un papel clave.

En este sentido, los presentes resultados muestran que las variaciones en la composición de ácidos grasos con el envejecimiento y la longevidad son complejas, de modo que los ácidos grasos presentan un patrón característico de edad y localización;

hecho que ya ha sido descrito con anterioridad (Pamplona, 2008). En primer lugar, centrándonos en los resultados obtenidos en cerebro, se puede deducir que no todos los cambios en ácidos grasos específicos tendrían el mismo peso en lo que a envejecimiento y longevidad se refiere, dado que algunos de ellos no cambian con la edad. Ambos, viejos y longevos, presentan variaciones similares en otros, lo que llevaría a pensar también en una escasa influencia directa sobre el alcance de la longevidad. Sin embargo, hay que considerar que esos cambios en una localización dada podrían derivar en mecanismos homeostáticos diferentes a lo largo de un envejecimiento normal o en el envejecimiento saludable. Éste es el caso, por ejemplo, de los ácidos oleico (18:1n-9) y eicosapentanoico (20:5n-3) en cerebro, cuyo aumento y disminución, respectivamente, se produce en igual magnitud en viejos y longevos con respecto a los adultos.

Si observamos detenidamente las peculiaridades que caracterizan al cerebro de los longevos, vemos primeramente que, en efecto, la menor susceptibilidad de sus membranas lipídicas a la oxidación se corresponde con una fracción disminuida de ácidos grasos poli-insaturados. Dado que éstos son sintetizados de manera general mediante la modificación de ácidos grasos saturados precursores a través de las enzimas desaturasas, cambios en la expresión y/o regulación de la actividad de las mismas podrían iniciarse de manera temprana en el proceso de envejecimiento en tejidos altamente diferenciados, contribuyendo a este hecho. En este sentido, hay que destacar que los longevos presentan menores valores del ácido graso muy insaturado docosapentanoico de la serie 6 (22:5n-6) y mayores del mono-insaturado palmitoleico (16:1n-7). Es más, el cambio en la composición de ácidos grasos insaturados específicos exclusivo al cerebro de longevos lo encontramos precisamente en los menores niveles de ácido docosapentanoico de la serie 6. Si existe una relación directa entre este hecho y los menores niveles de AASA en el cerebro de longevos merece futuras investigaciones, al igual que sucede con los menores niveles de ácido docosapentanoico de la serie 3 en el cerebro de los viejos coincidentes con sus menores valores de CEL. En cualquier caso, estos hechos nos devuelven a la idea de que el control de no todos los ácidos grasos muy insaturados conduce a la prolongación de la longevidad, sino que un tipo específico tiene más importancia que otro en términos de envejecimiento y longevidad. Por tanto, unos valores bajos de ácido docosapentanoico de la serie 6 en cerebro podrían ser buenos candidatos a marcadores de longevidad en dicho órgano.

Por su parte, el cerebro de los viejos presenta mucho mayor contenido que el de los longevos en el ácido graso más insaturado, el docosahexanoico (22:6n-3), mientras que los

menores niveles de este ácido graso han sido relacionados con mayor longevidad entre especies (Pamplona et al., 1999; Hulbert et al., 2007). Otros ácidos grasos, cuyos niveles han sido asociados a mayor longevidad máxima entre especies son el araquidónico (20:4n-6) y el linoleico (18:2n-6), menores para el primero y mayores en el caso del segundo (Hulbert et al., 2007). Nuestros resultados muestran que no existen cambios en los valores de ácido araquidónico a lo largo de la edad en el cerebro de ratón. No obstante, los niveles de ácido linoleico disminuyen con la edad, pero se encuentran más preservados en longevos que en viejos. Precisamente, la importante disminución en este ácido graso en los viejos junto con sus menores niveles de estearidónico (18:4n-3) y de eicosadienoico (20:2n-6), y el mayor contenido en docosahexanoico, podrían estar relacionados con el mayor daño oxidativo general a proteínas que presenta el cerebro de los animales de esta edad.

Además, es necesario considerar que la insaturación global de los ácidos grasos se encuentra homeostáticamente regulada en los tejidos de mamíferos a través del control de la expresión génica (Maresca y Cossins, 1993). Como ya se ha apuntado anteriormente, estos mecanismos homeostáticos podrían variar de modo diferencial a lo largo del envejecimiento normal y saludable, y según la localización. En este sentido, es interesante observar en los presentes resultados, que a pesar de la ausencia de cambios en la longitud de la cadena, y en los índices de dobles enlaces y de peroxidizabilidad lipídica en bazo a lo largo de la edad, las fracciones lipídicas se encuentran profundamente modificadas. En viejos, el aumento en PUFA_n-6 parece compensarse con la disminución en PUFA_n-3 y MUFA. Esto no sucede en longevas, y en ellas encontramos valores bajos de UFA, principalmente de los MUFA, y altos de la fracción SFA.

Como se indicó previamente, las variaciones en la composición de ácidos grasos con el envejecimiento y la longevidad presentan un patrón característico de edad y localización (Pamplona, 2008). Así, por ejemplo, el bazo de los viejos sí que presenta mayores niveles de araquidónico, que como se ha comentado no sufre variaciones en cerebro. De esta forma, a pesar de que este ácido graso ha sido relacionado negativamente con la longevidad máxima entre especies (Hulbert et al., 2007), según nuestros resultados no supondría un marcador universal en ratón. No obstante, es interesante destacar que el bazo de los viejos muestra algunos cambios similares al cerebro, esto es, un mayor contenido en docosahexanoico, y menor de linoleico y de estearidónico. Estos cambios con el envejecimiento comunes a ambos órganos de origen tan dispar podrían ser potenciales

candidatos a marcadores universales de morbilidad en la vejez, lo que deberá confirmarse en futuros estudios, así como su posible relación con los mayores niveles de MDAL.

En **conclusión**, la edad está asociada a una evidente alteración en la composición de los ácidos grasos y fracciones lipídicas, que es diferente según la edad y la localización. No obstante, los individuos viejos presentan alteraciones en ácidos grasos específicos, que no existen en longevos, lo que les haría ser buenos candidatos a indicadores de morbilidad con la edad, mientras que los cambios en longevos que no se dan en viejos, podrían ser los que aseguran una mayor longevidad.

Por otra parte, a la acumulación de daño oxidativo a proteínas con el tiempo podría contribuir una disminución en la tasa de renovación de las mismas con la edad. El **proteasoma 20S** es el complejo preferentemente encargado de reconocer y degradar activamente estos productos (Grune et al., 1997; Davies, 2001). Sin embargo, se han descrito resultados contradictorios con respecto a los cambios en su actividad con el envejecimiento. También, es de gran interés el estudio de la actividad del proteasoma 20S en los individuos longevos, para conocer si éste es un factor clave en el mantenimiento de niveles de oxidación proteica controlados en estos individuos.

En general, los resultados del presente estudio muestran una mejor conservación de la actividad enzimática del proteasoma 20S en longevos que en viejos, con respecto a los adultos. Los cambios que se observan con la edad muestran interesantes particularidades dependiendo del órgano o incluso de la actividad enzimática considerada, la tipo quimiotripsina o la tipo caspasa. Así, mientras que la actividad del proteasoma 20S en viejos disminuye en corazón y pulmón, otras localizaciones no muestran cambios (ganglios axilares) o incluso aumento de función (hígado, leucocitos peritoneales). En riñón, la actividad quimiotripsina disminuye en los viejos, mientras que la caspasa aumenta. Los longevos no muestran cambios en los ganglios axilares, pero tampoco en pulmón. El corazón de los longevos parece mostrar valores más próximos a los de los adultos que el de los viejos. Por otra parte, el aumento en la actividad quimiotripsina en hígado es más marcado en los longevos que en los viejos, mientras que aquéllos muestran valores más preservados de actividad caspasa. Esta actividad caspasa también se mantiene preservada en el riñón de los longevos, mientras que la tipo quimiotripsina sufre una disminución similar a la de los viejos. Ambas actividades aumentan en los leucocitos peritoneales de los longevos, de manera similar a lo que sucede en los viejos.

En este sentido, si bien existen varios artículos en la literatura científica que han mostrado una disminución de la actividad proteasómica en una variedad de tejidos con la edad (Carrard et al., 2002), algunos autores ya han apuntado que el declive de la función proteasómica puede no ser universal (Agarwal y Sohal, 1994; Keller et al., 2000). Este hecho no es tan extraño si se considera que la actividad proteasómica se activa de manera general con el estrés oxidativo (Grune y Davies, 2003), de modo que en condiciones normales su activación será mayor cuanto mayor sea dicho estrés. No obstante, se ha comprobado también que puede llegar a inactivarse si éste es demasiado elevado. En este aspecto, estudios *in vitro* han demostrado que el proteasoma 20S puede activarse o inactivarse ante la producción de altos niveles de ROS dependiendo de la forma en que se encuentre antes de la exposición a los mismos, latente o ya activa, respectivamente (Conconi et al., 1996). Recordemos que el grado de estrés oxidativo que afecta a una determinada localización no es el mismo que afecta a otra, lo que va a depender de factores como los ya comentados con anterioridad; distinta tasa de producción de radicales libres, distinto contenido en defensas protectoras, grado de diferenciación de las células que componen el tejido, función que esas células desempeñan en el organismo y edad. Es más, la susceptibilidad a la activación/desactivación del proteasoma 20S por estrés oxidativo podría ser diferente en los animales viejos que en los longevos, lo que merece futuras investigaciones. También, influenciando estos cambios en la actividad, podrían existir variaciones en la expresión génica de las diferentes subunidades proteasómicas con el envejecimiento y la longevidad. En este sentido, se ha visto, en cultivos de fibroblastos procedentes de donantes de distintas edades, que los niveles de expresión de las subunidades proteasómicas disminuyen en estas células con el envejecimiento, manteniéndose más preservados en centenarios sanos (Chondrogianni et al., 2000).

Además, se ha sugerido que las distintas actividades peptidasas del proteasoma 20S podrían afectarse diferencialmente con la edad, habiéndose encontrado aumentos, disminuciones y ausencia de cambios con dependencia de la actividad considerada (Friguet et al., 2000; Carrard et al., 2002), lo que está de acuerdo con los presentes resultados. Este hecho puede estar relacionado con la demostrada regulación diferencial de los distintos tipos de actividades peptidasas del proteasoma 20S. Así, por ejemplo, se ha visto que algunas de estas actividades y no otras se inactivan con el aumento en productos finales de lipoxidación proteica (Conconi y Friguet, 1997; Bulteau et al., 2001), siendo el contenido de los cuales diferente según el envejecimiento normal o saludable y la localización. De nuevo,

podrían existir diferencias en la susceptibilidad a la activación/desactivación de un tipo determinado de actividad peptidasa entre viejos y longevos. En este sentido, algunos autores han sugerido acerca de la posible intervención de la chaperona HSP90 en respuesta a estrés oxidativo suave, incluyendo niveles moderados de CML, previniendo esta desactivación (Conconi y Fragué, 1997; Carrad et al., 2002; Schmid et al., 2008), lo que apunta direcciones para futuros estudios. Recordemos que el estudio del marcador CML reveló un aumento en el corazón de viejos con respecto a los adultos, mostrando los longevos niveles similares a éstos, mientras que no se observaron cambios significativos con la edad en ganglios axilares. Éste último hecho coincide con la ausencia de cambios observados en la actividad del proteasoma 20S con la edad en esta localización inmunitaria, mientras que en efecto los viejos presentan menor actividad del mismo en relación a los adultos en corazón. No obstante, si bien los longevos presentan dicha actividad a niveles más preservados en esta localización, éstos no llegan a ser idénticos a los de los adultos. Este hecho nos muestra que es difícil la interpretación aislada de las posibles consecuencias fisiológicas de los cambios observados en las actividades quimiotripsina y caspasa del proteasoma 20S con el envejecimiento y la longevidad, dado que menor actividad del proteasoma, al menos en los longevos según nuestros resultados, no significa necesariamente mayor daño. También podría indicar que en esa localización no se necesita la activación del proteasoma. Por tanto, se requieren futuros estudios que relacionen estos cambios en la actividad proteasómica en una localización determinada con los niveles de estrés y daño oxidativo en la misma, y si es posible también con su estado funcional. Además, no podemos olvidar que el sistema lisosómico es también crucial para la degradación de proteínas, de modo que los cambios en uno u otro sistema tendrán un efecto diferencial dependiendo del tipo celular y la contribución relativa a la tasa de proteólisis global de las rutas proteasómica y lisosómica, pudiendo éstas diferir si comparamos animales viejos y los que alcanzan la longevidad extrema.

Dado que no puede **concluirse** una disminución general de la actividad del proteasoma 20S a lo largo del proceso de envejecimiento, ésta podría contribuir especialmente a la acumulación de proteínas oxidadas en ciertas localizaciones, pero la oxidación sería probablemente el factor clave general de la misma. No obstante, en este sentido es necesario considerar también que el aumento en la actividad proteasómica en un lugar dado puede no ser suficiente para paliar la tasa de oxidación en esa localización, es decir, que el resultado neto podría ser igualmente una acumulación de proteínas dañadas, lo

que, como ya se ha comentado, debe ser objeto de futuras investigaciones. Además, existen otras actividades peptidasas del proteasoma 20S, como la tripsina, que podrían ser factores determinantes de una disminución generalizada en la efectividad de la actividad proteasómica (Carrad et al., 2002), y deberían ser consideradas en el futuro. Por último, el mantenimiento de una actividad tipo caspasa del proteasoma 20S en niveles próximos a los de los adultos podría ser un buen marcador de longevidad en la mayoría de tejidos, con la excepción de los pertenecientes al sistema inmunitario. En conclusión, los resultados del presente trabajo plantean numerosas e interesantes incógnitas que habría que intentar responder en un futuro.

5.1.2. Envejecimiento prematuro: Ansiedad crónica en mujeres, estrés psicosocial en personas sin hogar, y aislamiento social en la vejez de ratones hembras.

5.1.2.1. Cambios en la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica, y en los niveles de antioxidantes y de cortisol plasmáticos, en mujeres con ansiedad.

Como ya se ha comentado, el mantenimiento de una función adecuada de las células inmunitarias ha demostrado ser un buen marcador de salud y longevidad, tanto en ratón como en humano (Wayne et al., 1990; Guayerbas et al., 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Rosa et al., 2006; De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008). La desregulación a la baja o a la alta de determinadas funciones inmunitarias puede conducir a una pérdida de la homeostasis del organismo y por consiguiente de la salud, lo que tiene como consecuencia un aumento de la morbilidad y la mortalidad de los individuos. Este hecho se encuentra estandarizado en el caso de la disminución con la edad de funciones leucocitarias tales como la quimiotaxis, la fagocitosis, la linfoproliferación en respuesta a mitógenos, los niveles de IL-2 inducidos por los mismos y la actividad NK. También se ha demostrado el aumento a lo largo de la edad de otra serie de funciones, entre las que se encuentran la adherencia, los niveles de radical superóxido, anión generado en el estallido respiratorio en neutrófilos, y los de TNF- α en cultivos de sangre total en respuesta a LPS (Guayerbas et al., 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Arranz et al., 2008; De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008).

Es más, las funciones inmunitarias mencionadas se han estudiado previamente por nuestro grupo de investigación en los leucocitos, especialmente los peritoneales, de **ratones**

hembras que manifiestan ansiedad, y se ha comprobado un deterioro de las mismas en relación a los animales no ansiosos de su misma edad cronológica. Estos animales ansiosos presentan una inmunosenescencia y un envejecimiento general del organismo prematuros, que los conduce a una disminución en su esperanza de vida media (Viveros et al., 2001; 2007; Guayerbas et al., 2002a; 2002b; 2004; 2005a; 2005b; Puerto et al., 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente et al., 2003; Alvarado et al., 2005; 2006a; 2006b; Pérez-Álvarez et al., 2005; Álvarez et al., 2006; De la Fuente, 2008a; 2008b).

Con esos antecedentes, y sabiendo el paralelismo que hay entre la evolución con la edad en la función de los leucocitos peritoneales de ratón y la de los de sangre periférica humana (De la Fuente, 2008a; 2008b), nos propusimos conocer los cambios que se producen en las funciones mencionadas de linfocitos y neutrófilos, previamente descritas como marcadores de salud y longevidad, en las mujeres ansiosas con respecto a las controles no ansiosas de su misma edad.

Los **resultados** descritos en este apartado demuestran, en las mujeres con ansiedad, un declive de la quimiotaxis de los neutrófilos y linfocitos periféricos, de la fagocitosis de los neutrófilos, de la linfoproliferación estimulada con PHA así como de los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de esos mismos cultivos, y de la actividad NK. Sin embargo, los niveles de anión superóxido en neutrófilos y los de TNF- α en cultivos de sangre total en respuesta a LPS aparecen aumentados en dichas mujeres ansiosas. Todo ello se encuentra en congruencia con los resultados previamente descritos por nuestro grupo de investigación en ratones hembras que manifiestan ansiedad (Guayerbas et al., 2002a; 2002b; 2004; 2005a; Puerto et al., 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Alvarado et al., 2005; 2006a; Pérez-Álvarez et al., 2005; Álvarez et al., 2006; Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b). No obstante, la adherencia de los neutrófilos y linfocitos de sangre periférica de mujeres con ansiedad no varió con respecto a las controles no ansiosas, en contraposición a lo que sucede en macrófagos y linfocitos peritoneales de ratones hembras que manifiestan ansiedad, en los que dicha función aumenta en relación a sus respectivos controles (Puerto et al., 2002; De la Fuente, 2008a; 2008b).

Es bien sabido que las alteraciones psicológicas pueden dar lugar a cambios hormonales y bioquímicos con objeto de ayudar a mantener la homeostasis del organismo, pero resultando en ocasiones en un estrés fisiológico. Dado que el **cortisol** es el principal glucocorticoide que modula la ansiedad (Lundberg, 2005), su secreción aumentada por parte del eje HHA, lo cual se vería reflejado en la elevación de sus niveles plasmáticos,

puede incidir sobre la función inmunitaria, como de hecho ha sido comprobado en toda una serie de estudios (Madden y Livnat, 1991; Padgett y Glaser, 2003) y en otras aportaciones más recientes (Lekander et al., 2009). Es un hecho conocido que el cortisol puede dar lugar a cambios en funciones clave de las células inmunitarias como son la migración, proliferación, secreción de citoquinas, producción de anticuerpos y actividad citolítica (Madden y Livnat, 1991; Padgett y Glaser, 2003; Lekander et al., 2009). Nuestro grupo ha comprobado, en estudios previos, que a lo largo de la edad en humanos las funciones de linfocitos disminuyen en aquéllos en que los niveles de cortisol se ven aumentados (Vallejo et al., 2006). Por otra parte, los ratones ansiosos antes mencionados manifiestan alteraciones en el eje HHA con aumento en los niveles de corticosterona (Pérez-Álvarez et al., 2005; Viveros et al., 2007). En las mujeres con ansiedad (diagnosticada a través del Inventario de Ansiedad de Beck) estudiadas en el presente trabajo, se valoraron sus niveles de cortisol plasmático, mostrando los mismos un aumento significativo en relación a los presentes en las mujeres no ansiosas (controles), lo que podría contribuir de forma importante en el deterioro de la función inmunológica que presentan dichas mujeres con ansiedad.

Por otra parte, algunos estudios han relacionado la secreción aumentada de glucocorticoides con un alto nivel de **estrés oxidativo** (Jekell et al., 2004), que como ya se ha comentado se encuentra en la base de la disfunción inmunológica que se produce con la edad (De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008a; 2008b). Los ratones ansiosos muestran un estrés oxidativo elevado, evidenciado por el aumento en una amplia variedad de marcadores de oxidación y por la disminución en el contenido en defensas antioxidantes, tanto en sus leucocitos peritoneales como en otros tejidos, entre los que se incluyen el bazo y el cerebro (Alvarado et al., 2006a; 2006b; Álvarez et al., 2006; Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b). En este sentido, algunos autores han descrito que la determinación de la capacidad antioxidante total del plasma es un buen marcador del nivel de estrés oxidativo del organismo (Aycicek et al., 2005). La valoración de esta capacidad en el plasma de las mujeres ansiosas estudiadas en el presente trabajo, muestra que la misma se encuentra disminuida al comparar con los niveles de las controles. Esto podría reflejar una menor capacidad para hacer frente a un aumento de ROS. Dado que las células inmunitarias son especialmente sensibles al daño de sus biomoléculas causado por estrés oxidativo (Izgüt-Uysal et al., 2004) y que sus funciones se encuentran íntimamente ligadas a la génesis de ROS, el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes es esencial para estas

células. Como ya hemos visto, el desequilibrio entre ambos tipos de compuestos podría comprometer la función de las células inmunitarias (Berlett y Stadtman, 1997), impidiendo una adecuada respuesta inmune (Víctor et al., 2004).

De hecho, en el presente estudio se observa que los neutrófilos de las mujeres ansiosas presentan un estallido respiratorio aumentado, con la consecuente génesis e incremento de los niveles de ROS, tales como el **anión superóxido**, hecho que también hemos encontrado en personas mayores (Arranz et al., 2008; De la Fuente et al., 2008). De manera similar, estudios previos realizados por nuestro grupo en leucocitos peritoneales de ratones ansiosos y prematuramente envejecidos han descrito niveles aumentados de este radical en comparación con los controles no ansiosos (Guayerbas et al., 2002b; Viveros et al., 2007). También, Bouayed et al. (2007) estudiaron la relación entre la ansiedad y los niveles intracelulares de ROS en los granulocitos periféricos en ratones, encontrando una relación lineal entre ambos. Estos mismos autores han comprobado en un estudio posterior que los altos niveles de ansiedad en ratones aumentan los niveles de ROS no sólo en esas células, también en monocitos y linfocitos (Ramal et al., 2008). En este sentido, recordemos de nuevo que a pesar de que la producción de ROS es un mecanismo importante de destrucción de microorganismos por parte de los fagocitos, existen evidencias de correlación positiva entre bajos niveles de superóxido y alta actividad bactericida (Boxer, 1995). Por el contrario, se ha visto que una excesiva generación de superóxido no tiene un efecto paralelo sobre la capacidad bactericida de estas células (Wolach et al., 2000). Es más, los altos niveles de ROS pueden causar daño y muerte celular (Lum y Roebuck, 2001). En efecto, un exceso de ROS generado por los fagocitos puede dañar los lípidos de membrana, resultando en la alteración de la fluidez de la misma y por tanto de las funciones que dependen de ella, dentro de las que se incluyen la **quimiotaxis** y la **fagocitosis** (Víctor et al., 2003b; Izgüt-Uysal et al., 2004). De acuerdo con esto, las mujeres ansiosas estudiadas en el presente trabajo muestran un deterioro de la quimiotaxis de sus células inmunitarias así como un declive en la capacidad fagocítica por parte de sus neutrófilos. Estos resultados confirman datos previos descritos por nosotros y por otros autores con la edad y en presencia de ansiedad tanto en modelos humanos como murinos (Sacerdote et al., 1999; Guayerbas et al., 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b; Arranz et al., 2008; De la Fuente et al., 2008).

En relación a las **citoquinas**, moduladores esenciales de las interacciones que se producen en la inmunidad celular y humoral, y cuyos cambios a nivel de producción por parte de los leucocitos podrían jugar un papel crucial en el deterioro de la función inmunitaria asociado a la presencia de ansiedad, se ha observado en el presente estudio que las mujeres ansiosas tienen mayores niveles de **TNF- α inducidos por LPS** en cultivos de sangre total que las controles. Este hecho concuerda con observaciones previas realizadas por otros autores en humanos con ansiedad (Maes et al., 1998) y por nosotros en mujeres ancianas, en las que dichos niveles disminuyen gracias a la administración de precursores del glutatión (Arranz et al., 2008). También, datos previos de nuestro grupo en leucocitos peritoneales de ratones con ansiedad han mostrado aumentos en los niveles de TNF- α inducidos por LPS (Viveros et al., 2007; De la Fuente, 2008a; 2008b), mientras que en ratones a distintas etapas del proceso de envejecimiento hemos encontrado tanto aumentos (Puerto et al., 2005) como disminuciones y ausencia de variaciones (véanse los resultados al respecto en los viejos y muy viejos, respectivamente, estudiados en el primer subobjetivo de la presente tesis).

En este punto sería conveniente incidir de nuevo brevemente en las posibles razones que explican estas diferencias. Recordemos la estrecha relación que existe entre el NF κ B y las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , y el hecho de que las rutas sensibles al estado redox que desencadenan la activación del NF κ B son diferentes dependiendo de los tipos celulares presentes en el sistema (Gloire et al., 2006), que cambian con la edad (Puerto et al., 2005) y también con el estado de ansiedad (Cohen et al., 1999). Por otra parte, nuestro grupo ha comprobado, en estudios longitudinales previos, que la respuesta de TNF- α a una inyección de LPS *in vivo* presenta unos tiempos de producción a picos (Álvarez, 2006), cuyos máximos, tanto en amplitud como en tiempo, podrían variar en función de la edad y del grado de ansiedad. En este sentido, se debe considerar que los ratones viejos empleados por Puerto et al. (2005) se encontraban en una edad intermedia entre los viejos y muy viejos estudiados en el primer subobjetivo de la presente tesis, mientras que los adultos eran más jóvenes que los adultos maduros usados por nosotros.

También sería necesario tener en cuenta que los leucocitos de determinadas localizaciones, como el peritoneo, se encuentran expuestos a una elevada carga antigénica, mientras que la que tienen que hacer frente los de sangre u otros órganos internos, asépticos en condiciones normales, es baja. En peritoneo, esto podría traducirse en que los leucocitos de los sujetos viejos estudiados en la presente tesis producen mayores cantidades

de TNF- α en condiciones basales resultado de un exceso de activación de la ruta del NF κ B, como se describió previamente. Sin embargo, ante la presencia de un patógeno, mimetizado en nuestro caso por el LPS, esas mismas células no son capaces de responder al estímulo, es decir, que la respuesta de TNF- α es baja cuando la inflamación es realmente necesaria para combatir la infección. No obstante, en localizaciones asépticas en condiciones normales, como sangre u otros órganos internos, la presencia de agentes patógenos conduce a un exceso de inducción de los niveles de TNF- α en individuos de edad avanzada (Arranz et al., 2008) y en ratones con ansiedad (Kinsey et al., 2008), que podrían dar lugar a daño. Este hecho sería lo que reproducimos ahora con respecto a los niveles de TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de sangre total en respuesta a LPS en las mujeres con ansiedad. En este aspecto, es necesario considerar que la incubación de sangre total con LPS tiene como objetivo la simulación de bacteremia o endotoxemia *ex vivo*, y el estudio de la consiguiente respuesta inflamatoria sistémica a la que ésta daría lugar dentro del organismo. Las citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α y las moléculas oxidantes producidas durante la misma pueden resultar beneficiosas o perjudiciales para el hospedador dependiendo de sus niveles y las circunstancias específicas. Como se ha comentado, los niveles adecuados son necesarios para combatir la infección, mientras que su exceso puede ser deletéreo (Grimble, 1998). En relación a este aspecto, se ha observado que los animales viejos muestran una respuesta mucho más elevada de la vía del NF κ B ante diversos estímulos en modelos de isquemia cerebral y de endotoxemia, mientras que los estrógenos previenen de la inflamación excesiva a través de la atenuación de dicha vía (Wen et al., 2004; Park et al., 2006; Sunday et al., 2006; 2007). Es más, una activación del NF κ B excesiva se ha relacionado con un aumento de la mortalidad en modelos de shock endotóxico letal agudo (Víctor y De la Fuente, 2003), en los que el NF κ B es regulado a la baja por precursores del glutatión, previniendo así de la oxidación y la inflamación excesivas (Víctor y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003a).

Además, el TNF- α en exceso puede potenciar la producción de moléculas de **adhesión** vía NF κ B (Collins, 1993; Víctor et al., 2004). No obstante, nuestros resultados muestran ausencia de cambios en la adherencia de los leucocitos procedentes de las mujeres ansiosas. De esta forma, la menor capacidad antioxidante total que se encuentra en ellas podría reflejar una mayor captación o utilización de antioxidantes plasmáticos por parte de las células inmunitarias, con objeto de neutralizar el aumento de la expresión de moléculas de adhesión y de otros eventos relacionados con el mayor estrés oxidativo.

Además, unos niveles elevados de TNF- α podrían contribuir al declive de la función quimiotáctica, puesto que se ha visto que esta citoquina es capaz de inducir la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos (Hirokawa et al., 1998).

Con respecto a los niveles de **IL-2 inducidos por PHA**, los presentes resultados muestran valores disminuidos en las mujeres ansiosas con respecto a las controles no ansiosas. Otros autores han descrito resultados similares en situaciones emocionales de ansiedad (Koh y Lee, 1996) y esto mismo se ha observado a lo largo de la edad (Arranz et al., 2008). Considerando que la IL-2 es un estímulo fundamental para que se lleven a cabo las **respuestas linfoproliferativas** y la **NK** (Solana et al., 1999), su disminución podría estar relacionada con el deterioro de dichas funciones encontrado en las mujeres ansiosas estudiadas en el presente trabajo. De acuerdo con estos resultados, varios estudios han descrito una estrecha relación entre la ansiedad y una disminución de las respuestas proliferativas de los linfocitos inducidas por PHA así como de la NK, tanto en humano como en ratón (Kiecolt-Glaser et al., 1984a; Esterling et al., 1993; Zorrilla et al., 1994; Koh y Lee, 1996; Leonard y Song, 1996; Maes et al., 1998; Borella et al., 1999; Guayerbas et al., 2002a; Alvarado et al., 2005), de manera similar a lo que sucede a lo largo del envejecimiento (De la Rosa et al., 2006; Arranz et al., 2008; De la Fuente, 2008a; 2008b; De la Fuente et al., 2008). En este aspecto, como ya se mencionó con anterioridad, los niveles aumentados de cortisol inducidos por la ansiedad pueden inhibir la secreción de ciertas citoquinas, la proliferación de las células inmunitarias y la actividad citolítica (Padgett y Glaser, 2003). Además, existen varios artículos en la literatura científica que evidencian un efecto inhibitorio del exceso de ROS sobre la linfoproliferación (Pahlavani y Harris, 1998; Arai et al., 2004) y sobre la producción de IL-2 a través de la inducción del NF κ B (Arai et al., 2004).

En **conclusión**, en vista de todo lo anteriormente comentado, podría deducirse que un alto nivel de ansiedad conduce a un importante deterioro de la respuesta inmunitaria, al menos en lo referente a las diferentes funciones de la inmunidad innata, celular y NK, así como los niveles de citoquinas, estudiados en el presente trabajo. Además, nuestros resultados muestran que este declive temprano podría estar relacionado con el aumento de la secreción de cortisol por parte del sistema HHA en situaciones emocionales de ansiedad, que daría lugar a una condición de estrés oxidativo que se vería reflejada en una capacidad antioxidante total plasmática disminuida. Dado que los parámetros inmunológicos investigados son buenos biomarcadores de salud y longevidad, el deterioro temprano de los

mismos podría reflejar un proceso de envejecimiento prematuro, signo de mayor morbilidad. Así, una capacidad general de respuesta disminuida por parte del sistema inmunitario en las mujeres ansiosas podría resultar, a largo plazo y en ausencia de tratamiento, en frecuentes procesos infecciosos y otros tipos de enfermedades relacionadas con un sistema inmunitario defectuoso, lo que señala posibles direcciones para futuros estudios, dado que una proporción importante de adultos jóvenes que consultan con los facultativos de medicina general padecen algún tipo de desorden de ansiedad no diagnosticado ni tratado adecuadamente (Wittchen y Boyer, 1998).

No obstante, para la generalización de los presentes resultados, se hacen necesarios futuros estudios que los repliquen en una población de mayor tamaño muestral, en los que se explore también las posibles diferencias en función del sexo, dado que nuestra investigación se centró únicamente en mujeres. Otra **limitación** de nuestro estudio deriva del hecho de que el momento del ciclo menstrual puede afectar a la función inmunitaria. A pesar de que las participantes del presente trabajo no se encontraban ni ovulando ni menstruando, son necesarios futuros estudios que investiguen el papel que juegan los niveles hormonales de estrógenos y progesterona en la inmunidad de las mujeres ansiosas. Además, aunque todas las mujeres de ambos grupos experimentales estudiadas en el presente trabajo habían recibido al menos una educación escolar básica y pertenecían a la clase media-alta, es decir, que no tenían preocupaciones económicas, investigaciones que consideren otras características sociodemográficas importantes, tales como el estatus familiar o laboral, serían sin duda de gran interés, dada la repercusión que todas esas características tienen en la funcionalidad inmunitaria (Recepto et al., 1995).

5.1.2.2. Efecto de la situación de estrés psicosocial en personas sin hogar sobre diversas funciones de los leucocitos de sangre periférica, y sobre los niveles de antioxidantes y de cortisol plasmáticos.

A pesar de la alta prevalencia de problemas de salud en la población sin hogar, y estando la mayoría de ellos relacionados con un funcionamiento defectuoso del sistema inmunológico, éste ha recibido relativamente poca atención como objetivo de investigaciones científicas. Algunos autores han sugerido que las personas sin techo padecen de una inmunidad alterada (Jackson y Spach, 1996). Sin embargo, el presente trabajo es, a nuestro conocimiento, el primero en estudiar una variedad de parámetros

inmunitarios, previamente descritos como buenos marcadores de salud y supervivencia (Levy et al., 1991; Ferguson et al., 1995; De la Fuente, 2002; 2008a; 2008b; Guayerbas et al., 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2004), en personas sin techo con respecto a las que disponen del mismo.

Nuestros **resultados** demuestran una respuesta inmunológica fuertemente suprimida en las personas sin hogar con respecto a aquéllas que lo tienen, de su mismo sexo y edad, al menos en lo que a los siguientes parámetros se refiere: capacidad de adherencia y de quimiotaxis tanto de neutrófilos como de linfocitos, capacidad fagocítica y niveles de anión superóxido de los neutrófilos, linfoproliferación en respuesta a mitógenos de las células T y niveles de IL-2, así como la actividad NK. La capacidad antioxidante total del plasma también se encontró disminuida en las personas sin techo.

La **función adherente** de las células inmunitarias ha sido escasamente estudiada en el contexto de la psiconeuroinmunología. Como hemos visto, se han descrito tanto aumentos como ausencia de cambios en este parámetro en modelos murinos y humanos de ansiedad (Puerto et al., 2002; Arranz et al., 2007). En contraste, curiosamente, los leucocitos de las personas sin hogar presentan una adherencia muy disminuida con respecto a los controles. No obstante, ello también puede estar mostrando una peor funcionalidad, ya que podría traducirse en una mayor dificultad por parte de las células inmunitarias para desplazarse por la superficie de las células endoteliales, para realizar los contactos mediados por integrina con las mismas, y la consiguiente diapédesis a través de la lámina endotelial. Se suma a esta idea el hecho de que, en efecto, la **quimiotaxis** de los leucocitos al foco de infección bacteriana aparece deteriorada en el colectivo de los sin techo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos tanto por nosotros como por otros autores en respuesta a ansiedad en modelos humanos y murinos (Sacerdote et al., 1999; Guayerbas et al., 2002b; Puerto et al., 2002; Arranz et al., 2007). No obstante, algunos estudios han indicado ausencia de cambios en la quimiotaxis de neutrófilos procedentes de pacientes con depresión (Maes et al., 1992).

En lo que respecta a la **capacidad fagocítica de los neutrófilos**, los presentes resultados demuestran un fuerte deterioro funcional en los individuos sin hogar. En este aspecto, a pesar de que algunos autores han realizado observaciones similares en pacientes con depresión (Leonard y Song, 1996), otros no encontraron cambios (Maes et al., 1992). Por otra parte, los estudios en modelos murinos y humanos de ansiedad también han mostrado una función fagocítica disminuida (Guayerbas et al., 2002b; Puerto et al., 2002;

Arranz et al., 2007). De manera interesante, la destrucción de bacterias mediante radicales intracelulares de oxígeno, tales como el **anión superóxido**, también parece ser una función deprimida en las personas sin techo en comparación con los controles, lo que podría sugerir, dentro de este contexto de carencia general de respuestas funcionales, que las células fagocíticas de los sin techo presentan una capacidad defectuosa de generación de intermediarios reactivos de oxígeno, que haría a estas personas más vulnerables a las infecciones bacterianas. Sin embargo, Maes et al. (1992) no encontraron tales cambios en pacientes con depresión, mientras que, como ya se comentó con anterioridad, estudios de nuestro grupo han mostrado niveles aumentados de este anión en presencia de ansiedad (Arranz et al., 2007).

En suma, considerando este estado de depresión funcional generalizada que presentan los neutrófilos de las personas sin techo, estas células podrían encontrarse implicadas en la mayor susceptibilidad a enfermedades físicas, tales como infecciones bacterianas, que sufre este colectivo.

Además, la **respuesta proliferativa de los linfocitos** de las personas sin techo se encuentra marcadamente reducida ante el mitógeno PHA. Varios estudios acerca de estrés crónico, desórdenes de depresión, ansiedad y soledad han encontrado estas condiciones fuertemente relacionadas con una respuesta linfoproliferativa inducida por PHA disminuida (Kiecolt-Glaser et al., 1984b; Maes et al., 1989; Arranz et al., 2007). Por tanto, dichas condiciones psicológicas podrían contribuir de manera importante al declive de la función linfoproliferativa de las células T encontrado en los individuos sin techo. Esta observación sugiere una inmunidad celular reducida en ese colectivo, que podría ser una razón fundamental, unida a su mayor exposición a agentes causantes de enfermedad (Bor y Epstein, 1991) y a sus conductas de mayor riesgo (Chau et al., 2002), para el mayor padecimiento de enfermedades infecciosas que suelen experimentar.

En lo que respecta a la **actividad NK**, los resultados indican una función suprimida en el colectivo sin hogar. Nuestro grupo y otros autores han observado una citotoxicidad NK reducida en presencia de desórdenes de ansiedad y depresión (Herbert y Cohen, 1993; Arranz et al., 2007). Es más, la soledad, que es una condición fuertemente relacionada con la depresión, también parece derivar en la inhibición de esta función (Kiecolt-Glaser et al., 1984b). Por tanto, la mayor prevalencia de cáncer e infecciones virales entre los sin techo, en comparación con el colectivo que dispone del mismo, puede ser debida no sólo a

conductas de riesgo aumentadas en aquéllos (Chau et al., 2002), sino también a su menor capacidad de respuesta ante el cáncer y los virus.

Un posible mecanismo que asocia la condición sin techo a una respuesta inmunitaria más pobre es a través de vías de estrés oxidativo. La **capacidad antioxidante total del plasma**, buen marcador de estrés oxidativo, se encuentra disminuida en los sujetos sin techo, lo que refleja una menor capacidad para hacer frente, de manera rápida y eficaz, a un aumento de ROS que podría comprometer las funciones celulares. Como ya se ha comentado anteriormente, obtuvimos resultados similares en lo que respecta a los antioxidantes plasmáticos en mujeres con ansiedad (Arranz et al., 2007). El estrés oxidativo podría dañar macromoléculas de importancia biológica, tales como los lípidos de membrana, que son particularmente sensibles a la peroxidación, resultando en una alteración de la fluidez de membrana y de funciones dependientes de la misma, tales como la quimiotaxis y la fagocitosis (Víctor et al., 2003b). En coherencia con esta idea, podría entenderse que la quimiotaxis de las células inmunitarias hacia el foco de infección y la capacidad fagocítica de los neutrófilos se encuentran disminuidas en los sin techo. Además, un mayor estrés oxidativo también se ha relacionado con la supresión de la producción de ciertas citoquinas, tales como la **IL-2** (Arai et al., 2004), importante estímulo para las respuestas linfoproliferativas y la actividad NK. De acuerdo con esto, los presentes resultados muestran que los sin techo presentan niveles de IL-2 más bajos junto con una marcada reducción de la respuesta proliferativa de los linfocitos a PHA, y también una actividad NK significativamente disminuida, todo ello congruente con observaciones previas realizadas por nosotros en mujeres ansiosas (Arranz et al., 2007).

Sin embargo, a pesar de que, como se ha venido discutiendo, la condición de “**sin techo**”, la ansiedad y la depresión comparten en general algunos de sus efectos principales sobre el sistema inmunitario, la condición de “sin techo” parece aportar ciertos rasgos específicos al panorama general, contribuyendo a un estado de insensibilización generalizado de los leucocitos. Las personas sin hogar estudiadas en el presente trabajo sufrían en efecto de ansiedad y de depresión, pero se debe considerar que la exclusión social podría contribuir de manera importante, a través de sentimientos de angustia y rechazo, a las diferencias existentes en los cambios inmunitarios observados en las personas sin techo en comparación con los encontrados en otros estudios en personas con hogar pero aquejadas de ansiedad y depresión (Wu et al., 2000; Wong y Piliavin, 2001; Eisenberg et al., 2003; Pressman et al., 2005). Además, se ha descrito que vivir en las calles o en

albergues inadecuados es una fuente de estrés en sí mismo, ya que está relacionado con condiciones de vida atestadas, exposición a los elementos, higiene limitada y episodios de violencia diarios (Goodman et al., 1991; Wong y Piliavin, 2001). Varios estudios han encontrado que las personas sin hogar poseen más probabilidad de tener hábitos que ponen en mayor riesgo su salud, incluyendo menos horas de sueño, mayor propensión al abuso de alcohol y drogas, nutrición más pobre y menor práctica de ejercicio físico, teniendo todas estas conductas consecuencias inmunológicas (Irwin et al., 1994; Razak et al., 2008). Las personas sin techo estudiadas en el presente trabajo se alimentaban a base de dietas saludables, que les proporcionaban una nutrición óptima, en el centro de día/comedor de beneficencia del que fueron reclutadas, por lo que es poco probable que la nutrición juegue algún papel en los cambios inmunitarios que sufren. Además, el abuso de alcohol y drogas fue uno de criterios de exclusión considerados en el presente estudio. No obstante, se hacen necesarios futuros estudios para comprender enteramente estas cuestiones.

En el presente trabajo, se estudió también otro posible mecanismo vinculante entre la condición sin techo y el declive de la función inmunitaria, a través de cambios relacionados con el estrés en el **eje HHA** y en la producción de **citoquinas proinflamatorias**. La ansiedad y la depresión se encuentran frecuentemente asociadas a regulaciones alteradas en el eje HHA (Müller et al., 2002; Lundberg, 2005; Arranz et al., 2007). El cortisol juega un importante papel en la regulación de las emociones, y varios estudios han mostrado que su aumento tiene un efecto depresor sobre la función inmunitaria, alterando la migración de las células inmunitarias, la proliferación, la secreción de citoquinas proinflamatorias, la producción de anticuerpos, y la actividad citolítica (Madden y Livnat, 1991; Padgett y Glaser, 2003). Así, las mujeres ansiosas, que tenían niveles más altos de cortisol, también presentan mayores niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en los sobrenadantes de sangre total cultivada en las mismas condiciones experimentales que las usadas en las personas sin techo, las cuales no muestran cambios significativos con respecto a los controles, ni en el $\text{TNF-}\alpha$ ni en el cortisol. De nuevo, a pesar de que los cambios en la regulación HHA bajo las condiciones de estrés, ansiedad y depresión han sido estudiados extensamente, no se comprenden todavía totalmente debido al alto grado de solapamiento entre esas tres condiciones citadas. Por ejemplo, Lechin et al. (1996) apuntaron que la falta de habilidad para enfrentarse al estrés da lugar a un aumento en las concentraciones plasmáticas de cortisol mientras que la depresión muestra un patrón

opuesto consistente en hiporresponsividad por parte de las glándulas adrenomedulares. No obstante, en la literatura científica se han descrito resultados contradictorios con respecto a la depresión y el cortisol. Por otra parte, la ansiedad se ha relacionado con un aumento en los niveles de cortisol plasmático (Arranz et al., 2007). De acuerdo con esto, es difícil predecir lo que podría suceder en los individuos que sufren de las tres condiciones, que podrían también no mostrar cambios en los niveles plasmáticos de esta hormona. No obstante, la presencia de receptores en las células inmunitarias así como su respuesta ante unos mismos niveles hormonales podría diferir en las personas sin hogar. También, otras hormonas y neurotransmisores, tales como noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, beta-endorfina o melatonina, destacan como posibles candidatos para futuras investigaciones que intenten comprender mejor los cambios inmunitarios que se producen en el colectivo sin techo.

Es importante considerar que aunque, en este estudio, recogimos las muestras de manera muy estricta a lo largo de un intervalo del día lo más reducido que nos fue posible, esto es, 4 horas (desde las 10.00 h de la mañana hasta las 14.00 h del mediodía), esto ha podido ser una fuente de **sesgo**, dado que los niveles de cortisol presentan un ritmo pulsátil diurno muy marcado, con máximos alcanzados tempranamente de mañana, que van disminuyendo a lo largo del día. Por esta razón, nuestros resultados al respecto deben ser tenidos en cuenta con cierta cautela. Es más, otra limitación del presente trabajo deriva del hecho de que los periodos de sueño y actividad podrían ser diferentes en las personas sin techo de las control, lo que podría influenciar el ritmo del eje HHA mediante la inducción de un cambio en el ritmo circadiano normal de secreción de glucocorticoides, que podría tener consecuencias sobre la modulación del funcionamiento del sistema inmunitario por parte de éstos (Hiemke et al., 1995). Por tanto, serían aconsejables futuros estudios reduciendo el periodo de recogida de la muestra y realizando ensayos múltiples por sujeto y día. Por otra parte, debido a razones técnicas, no fue posible realizar en todas las muestras la determinación de cortisol, antioxidantes totales y citoquinas, lo que puede haber afectado negativamente a la potencia estadística del presente trabajo.

Además, en este estudio, se intentó constituir un grupo de personas sin techo lo más representativo posible, para lo cual se establecieron rigurosos criterios de exclusión basados en el estado de salud mental y física, que podrían haber sesgado algunas determinaciones. No obstante, la media de tiempo que habían pasado sin techo las personas pertenecientes a este grupo fue relativamente corta, y algunos de ellos no eran

estrictamente sin techo sino personas sin techo adecuado. Por tanto, los cambios inmunológicos observados son dignos de especial atención, porque el colectivo estudiado en este trabajo podría disfrutar de mejor salud que la población general de personas sin techo. También, habría que indicar que nuestros resultados necesitarían ser confirmados en un grupo sin techo de mayor tamaño.

Las **conclusiones** que se desprenden del presente trabajo tienen significativas implicaciones sobre la política del cuidado de la salud social y apuntan direcciones para futuras investigaciones. El deterioro generalizado de la función inmunitaria en las personas sin techo puede explicar la mayor susceptibilidad a infecciones que sufre esta población y puede también empeorar la progresión de procesos patológicos en curso, tales como el cáncer, contribuyendo así a un aumento de la morbilidad y mortalidad de estas personas. Son necesarios futuros trabajos que estudien las posibles rutas que relacionan la condición sin hogar con la respuesta inmunitaria, pero de los presentes resultados se extrae que el estrés oxidativo parece jugar un papel importante. De esta forma, estrategias que traten de mejorar la función inmunológica y disminuir el estrés oxidativo que presentan los leucocitos serían de gran interés para mejorar la calidad de vida del colectivo sin hogar.

5.1.2.3. Efecto del aislamiento social durante la vejez en diversas funciones y el contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, así como sobre los niveles de corticosterona plasmática, en ratones muy viejos C57BL/129Sv hembras.

Este trabajo presenta el primer modelo animal que aborda experimentalmente una situación común para muchas personas mayores, y especialmente mujeres, que por distintas razones sufren la soledad durante su vejez tardía, a pesar de haber gozado de una vida social activa en etapas anteriores. En estudios previos empleando este mismo modelo hemos observado que el aislamiento en la vejez produce un fuerte impacto a nivel conductual y cognitivo, afectando a la capacidad de respuesta a situaciones novedosas, potencialmente ansiogénicas y que requieren funciones superiores de aprendizaje y memoria. De esta forma, los individuos expuestos a la soledad en su edad avanzada pueden tener una mayor vulnerabilidad a los trastornos mentales. También hemos observado que los individuos mejoran con la disminución de la novedad o el grado de dificultad, beneficiándose de la práctica (Arranz et al., 2009).

Con los resultados presentados en esta tesis se comprueba cómo este deterioro conductual puede estar relacionado con un aumento en los niveles de **corticosterona** plasmática en reposo. Otros autores han observado concentraciones intensificadas de esta hormona en respuesta al aislamiento social en modelos animales en sujetos más jóvenes (Bowers et al., 2008). El presente trabajo demuestra que la falta de lazos sociales en la vejez intensifica los niveles glucocorticoides, que se encuentran alterados con la edad (Wolf y Kudielka, 2008).

Dada la estrecha comunicación entre el sistema nervioso y el inmunológico, diversos factores ambientales como el estrés, ya sea por aislamiento u otras situaciones que implican adaptación a cambios ambientales extremos, comprometen la función inmunológica del individuo. Del mismo modo, la exposición continuada a estos factores podría derivar en estados de ansiedad crónica, desorden que tiene un fuerte impacto sobre funciones leucocitarias clave (Arranz et al., 2007).

Los presentes resultados muestran un deterioro muy marcado de la **función inmunitaria** en los ratones viejos aislados hembras en comparación con los animales de su misma edad mantenidos en grupo, que además es órgano-específico. El único parámetro cuyo declive es común a ambos órganos estudiados, timo y bazo, es la **proliferación** de los linfocitos **en respuesta a concanavalina A**, es decir, que algunas funciones esenciales de las células T parecen ser especialmente sensibles al aislamiento en la vejez *per se*.

A esta idea se suma que la **función NK** aparece fuertemente suprimida en las células mononucleares aisladas del timo, pero no en las obtenidas del bazo. En este sentido, hay que considerar las diferentes poblaciones celulares que se extraen de ambos órganos. Así, mientras que del timo se obtienen únicamente linfocitos T en un estado bastante puro, del bazo se extraen además linfocitos B, que son mayoritarios en el mismo, y monocitos, que también son células mononucleares que encuentran un reservorio importante en este órgano. La presencia mayoritaria de otras células podría enmascarar el deterioro de la función NK de los linfocitos T debido al aislamiento. De hecho, los monocitos pueden realizar funciones citotóxicas, que podrían estar compensando en bazo el declive de estas funciones por parte de los linfocitos T citotóxicos. Así, un estudio muy reciente indica que los animales aislados socialmente muestran mayor número de monocitos en bazo, con independencia de la edad (Kinsey et al., 2008). Otro hecho a tener en cuenta es que en el bazo de los viejos no aislados se detectan valores funcionales muy bajos de NK, menores aún que los de timo.

Estas mismas células, los monocitos, podrían ser las responsables directas del aumento en los niveles de **TNF- α** inducidos por LPS en los cultivos de leucocitos mononucleares de bazo procedentes de ratones viejos aislados hembras con respecto a los que han mantenido una vida social normal, ya que estas diferencias no se observan en timo. Por esta misma razón, sería poco probable que los linfocitos T esplénicos fuesen los responsables primarios del aumento comentado, y tampoco los linfocitos B, puesto que la proliferación en respuesta a LPS en esos mismos cultivos, realizada de manera directa por estas células, no varía como consecuencia del aislamiento. No obstante, los monocitos también podrían ejercer una acción indirecta especialmente sobre los linfocitos B mayoritarios en el bazo pero también sobre los T, puesto que, como describieron Han et al. (1995), las células B y T esplénicas no responden produciendo **TNF- α** ante determinado estímulo a no ser que los monocitos se encuentren presentes, en cuyo caso el número de linfocitos B y T que libera **TNF- α** aumenta con la edad en dicho órgano. Así, el aislamiento en la vejez conduciría a una exacerbación de los niveles de **TNF- α** en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, aumentados con la edad (Kinsey et al., 2008).

Además, tal aumento con el envejecimiento en esta localización refuerza la idea de que la presencia de agentes patógenos, mimetizados en nuestro caso por el LPS, incluso en bajo nivel en lugares concretos tales como sangre u órganos internos esenciales, asépticos en circunstancias normales, conduciría a la activación excesiva de la vía del **NF κ B**, y enfatiza las diferencias en este proceso según los tipos celulares presentes. Según nuestros resultados el panorama podría ser aún más complejo si al proceso de envejecimiento se le suma un estrés crónico como el aislamiento social. Una vez iniciada esta vía en los individuos de avanzada edad, se produciría una respuesta inflamatoria descontrolada y excesiva que daría lugar al daño del órgano, que sería mayor en el bazo de las viejas aisladas.

También, los monocitos esplénicos aumentados en número (Kinsey et al., 2008) y su interacción fundamentalmente con las células mayoritarias del bazo, los linfocitos B, podrían jugar un papel importante en el aumento de la **quimiotaxis** leucocitaria, así como en los menores niveles intracelulares de **glutathione** en los leucocitos procedentes de este órgano de las viejas aisladas. El aumento en la quimiotaxis de los leucocitos esplénicos en animales aislados socialmente ha sido descrito recientemente por otros autores, y podría ser secundario a una inducción de insensibilización a los glucocorticoides en los esplenocitos (Kinsey et al., 2008). De manera interesante, estudios previos de nuestro grupo han mostrado aumentos con la edad en la quimiotaxis de leucocitos procedentes de órganos

inmunológicos, en contraste con la disminución que se produce en esta función en las células inmunitarias peritoneales o de sangre periférica (Medina et al., 1998).

En suma, nuestros datos apoyan a que los monocitos podrían contribuir a la creación de un ambiente oxidativo/inflamatorio, y a la consecuente exacerbación de procesos inflamatorios asociados al envejecimiento que se encuentren en curso, en los individuos de edad avanzada que además sean aislados socialmente.

No obstante, los resultados muestran que algunos parámetros no varían como consecuencia del aislamiento social en la vejez, como por ejemplo la proliferación basal y en respuesta a lipopolisacárido de las células tímicas y esplénicas, así como los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo estimulados con concanavalina A, que fueron similares en ambos grupos experimentales. A pesar de la involución tímica con la edad (Aw et al., 2007; Gruver et al., 2007) o precisamente por ello, no se muestran diferencias con el estrés del aislamiento social durante la vejez en funciones como la quimiotaxis de las células tímicas, su contenido intracelular de glutathione, ni los niveles de TNF- α inducidos por lipopolisacárido en los sobrenadantes de cultivos de las mismas, las cuales sí se modifican en el bazo. En la base de esta ausencia de diferencias probablemente se encuentra la ya comentada distinta composición celular de ambos órganos inmunocompetentes y su diferente afectación por la condición experimental estudiada.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede deducir que ambas condiciones; envejecimiento y aislamiento, unidas en las últimas etapas de la vida, tienen un efecto dramático sobre la función inmunitaria. Esto podría conducir a un declive acelerado de la salud y por tanto a una muerte prematura de los individuos de avanzada edad que se encuentran solos, de donde se deduce la importancia de preservar lazos sociales de calidad en la vejez. Sin embargo, a pesar del fuerte impacto que tiene el aislamiento en la vejez sobre funciones leucocitarias clave, no todos los marcadores estudiados se vieron afectados por el mismo y algunos se afectaron con dependencia de la localización considerada, de modo que estos individuos podrían verse muy beneficiados del hecho de volver a establecer relaciones sociales.

En **conclusión**, se demuestra por tanto la importancia del aislamiento y la soledad durante la vejez, exacerbando el deterioro inmunitario durante este período, y ello a pesar de haber mantenido una vida social normal durante las etapas vitales anteriores.

5.1.3. Envejecimiento patológico: Modelo murino para la enfermedad de Alzheimer.

Cambios inmunitarios, a nivel de diversas funciones y del contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, así como en la concentración de corticosterona plasmática, en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Los cambios en el sistema inmunitario con el envejecimiento así como los observados en individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer (AD) apuntan hacia la posible contribución de una inmunosenescencia prematura en el desarrollo de dicha enfermedad. Estudios recientes han mostrado que varias funciones inmunitarias que cambian con la edad, tales como la actividad fagocítica y la respuesta proinflamatoria, se encuentran también deterioradas en individuos con la enfermedad de Alzheimer (Richartz et al., 2005). De este modo, los sujetos con Alzheimer podrían mostrar cambios inmunológicos asociados al envejecimiento más marcados en comparación con los individuos sanos de la misma edad. Por tanto, el objetivo de este apartado fue estudiar el efecto del envejecimiento y el sexo sobre la red inmunoendocrina, en base a los cambios en la función del sistema inmunitario periférico y en los niveles de corticosterona respectivamente, en la cepa de ratón estándar salvaje C57BL/129Sv así como el impacto del Alzheimer sobre la misma. Para ello, empleamos animales adultos (6 meses de edad) y viejos (15 meses de edad) hembras y machos salvajes (no transgénicos, NTg), que se compararon también con hembras y machos viejos triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (de la misma cepa salvaje, pero con los transgenes *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} y *tau*_{P301L}, 3xTgAD).

Previamente, observamos que el estudio de la esperanza de vida de los ratones salvajes NTg y de los 3xTgAD, monitorizada desde los 6 hasta los 15 meses de edad, evidenció un aumento de la mortalidad en el grupo transgénico en comparación con los ratones salvajes NTg de la misma edad. La baja tasa de mortalidad en los machos viejos NTg (10%) se incrementó hasta el 40% en el grupo 3xTgAD (Giménez-Llort et al., 2008). También, se realizó un estudio conductual previo al trabajo descrito en la presente tesis, que mostró un aumento de las conductas relacionadas con la ansiedad al avanzar la edad, el cual fue aún mayor en los animales triple-transgénicos (Giménez-Llort et al., 2008).

Los resultados descritos en la presente tesis confirman que las hembras 3xTgAD viejas muestran una exacerbación del aumento en el **índice quimiotáctico** de los linfocitos esplénicos y tímicos que se produce con la edad en estas localizaciones en algunas cepas de ratones (Medina et al., 1998), y que se muestra también en la cepa salvaje de la que se obtuvo el modelo 3xTgAD.

La tendencia a la disminución de la **linfoproliferación** basal con la edad es similar en las células procedentes tanto de los ratones 3xTgAD como de los NTg. Sin embargo, la proliferación inducida por el mitógeno LPS de las células esplénicas de los machos se encuentra disminuida en los viejos triple transgénicos en relación a los viejos NTg. No obstante, en el timo de los ratones viejos 3xTgAD y NTg, se observa una disminución similar de la respuesta linfoproliferativa a ConA y LPS en relación a los animales adultos NTg. Algunos autores han sugerido que una menor proliferación de los linfocitos periféricos en respuesta a estímulos se correlaciona con una mayor gravedad de la enfermedad (Shalit et al., 1995), hecho que se muestra en nuestros resultados en los machos viejos 3xTgAD, en los linfocitos procedentes de bazo ante el estímulo LPS.

En células mononucleares de sangre periférica, Speciale et al. (2007) no encontraron diferencias con respecto a los niveles de **IL-2** tras 48h de cultivo de los mismos con diferentes estímulos, entre pacientes afectados de Alzheimer y controles de la misma edad. En el presente trabajo sí se aprecian unos niveles de IL-2 disminuidos en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos estimulados con ConA procedentes de machos viejos 3xTgAD, aunque en las hembras 3xTgAD aumentados, al compararlos con sus respectivos NTg de la misma edad y sexo.

En las células tímicas de los animales 3xTgAD se detecta el declive en la **función NK**, hecho que tiene lugar al avanzar la edad (Ferrández et al., 1999), anticipándose al suceso en los viejos NTg. Con respecto a la función citotóxica NK en pacientes de Alzheimer, se han descrito ausencia de variaciones con respecto a la población sana de la misma edad y sexo (Mäser et al., 2002), y también una supresión de la misma en presencia de la enfermedad (Aragá et al., 1991), hecho que reproducimos nosotros en timo, mostrando que este deterioro es más significativo en machos que en hembras al compararlos con los animales NTg de la misma edad y sexo.

El aumento asociado a la edad en los niveles de **TNF- α** inducidos por LPS que se produce en el timo de ambos sexos, es similar para los viejos NTg y 3xTgAD en comparación con los adultos NTg, mientras que en bazo sólo es detectable para los

animales 3xTgAD. En este sentido, los pacientes de Alzheimer han mostrado parámetros de inflamación aumentados, tales como elevados niveles de TNF- α plasmático (Zuliani et al., 2007; Bonotis et al., 2008), que se correlacionan con porcentajes aumentados de células mononucleares sanguíneas que expresan esta citoquina (Kassner et al., 2008). Es más, los niveles circulantes de TNF- α se relacionan directamente con la severidad de la enfermedad (Paganelli et al., 2002), y se ha observado que son los mejores predictores independientes de mortalidad en poblaciones de edad avanzada con alta tasa de mortalidad debida a distintas patologías asociadas al envejecimiento (Brüünsgaard y Pedersen, 2003). También, se han descrito niveles aumentados de TNF- α inducidos por LPS en ensayos de sangre total y en monocitos aislados de enfermos de Alzheimer en relación a los sujetos sanos (Lombardi et al., 1999; Guerreiro et al., 2007), de manera similar a los resultados descritos en la presente tesis en bazo.

Por tanto, en general, existen **cambios asociados a la edad en las funciones inmunitarias** estudiadas en ratones viejos NTg, algunos de los cuales son **más marcados en los 3xTgAD**, y especialmente en los **machos**. Dado que el sistema inmunitario es un buen marcador de salud y longevidad (Wayne et al., 1990), y las funciones estudiadas aquí han sido propuestas como marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Guayerbas et al., 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008a; 2008b), los resultados obtenidos podrían explicar la menor esperanza de vida los ratones 3xTgAD, especialmente en los machos, en los que la mortalidad asciende al 40%, lo que podría deberse, al menos en parte, a la inmunosenescencia prematura que manifiestan.

Los resultados descritos en la presente tesis son los primeros en la literatura científica en cuanto a los cambios con la edad en estas funciones inmunitarias en la cepa de ratón C57BL/129Sv y en los animales 3xTgAD. Es difícil establecer una estricta comparación con los resultados publicados en otras cepas de ratón, especialmente si consideramos que en una misma cepa, nosotros hemos observado una evolución diferente de estas funciones inmunitarias en función de la edad, el sexo y la localización considerada. Recordemos que el sistema inmunitario sufre un complejo remodelado a lo largo del envejecimiento, dando lugar en algunos casos a la aparición de procesos multifásicos en un intento del organismo por recuperar la homeostasis. Se hacen necesarios por tanto futuros estudios que caractericen estas funciones en dicha cepa en varias edades anteriores y posteriores a las empleadas en este trabajo, y tanto en animales NTg como 3xTgAD, para

conocer con exactitud el alcance de la inmunosenescencia prematura de los 3xTgAD y por tanto su edad biológica.

Las **diferencias sexuales** con respecto a la red neuroinmunoendocrina en la enfermedad de Alzheimer han sido escasamente estudiadas hasta el momento, y de hecho, a nuestro conocimiento, no existen datos en la literatura científica acerca de los cambios sexuales específicos en modelos animales de Alzheimer en las funciones inmunitarias periféricas estudiadas en el presente trabajo. Como ya se ha comentado, según nuestros resultados, los cambios en los niveles de IL-2 inducidos por ConA en linfocitos procedentes de bazo son especialmente dependientes de este factor, lo que podría haber resultado en la ausencia de variaciones descrita por los autores antes comentados (Speciale et al., 2007), si bien en timo, nosotros tampoco hemos detectado estas diferencias. En otras funciones, como la NK y la proliferación de linfocitos esplénicos inducida por el mitógeno LPS, nuestros datos muestran una marcada afectación de los machos con respecto a las hembras.

Además, los hombres afectados de Alzheimer padecen de un mayor estrés oxidativo, en base a una menor concentración de **glutation** reducido en eritrocitos en comparación con las mujeres que sufren de esta enfermedad y también con respecto a los controles sanos de la misma edad; hecho que no sucede en las mujeres (Liu et al., 2005). En este contexto, a pesar de que en efecto hemos detectado menores niveles de glutathione en las células esplénicas y tímicas de los animales viejos NTg con respecto a los adultos, esta disminución es similar en los viejos 3xTgAD de ambos sexos. No obstante, en los leucocitos mononucleares esplénicos es posible observar menores niveles de glutathione en los animales viejos machos, tanto NTg como 3xTgAD, con respecto a las hembras de sus respectivas condiciones. Esto concuerda con resultados previos en otras cepas de ratón que han mostrado un mayor estrés oxidativo en los machos que en las hembras en este tejido (Viveros et al., 2007).

El deterioro del sistema inmunitario periférico en el Alzheimer puede estar relacionado causalmente con la enfermedad, y también verse agravado de manera secundaria a la inflamación cerebral y activación del eje HHA, que podría resultar en la **hipercortisolemia** moderada que se observa en los pacientes con Alzheimer (Hartmann et al., 1997). Esta estimulación del eje conduciría a la depresión de algunas funciones del sistema inmunitario periférico (Woiciechowsky et al., 1999). Por otra parte, la neofobia o miedo a los ambientes nuevos, así como otras expresiones de menor capacidad para

afrontar el estrés, son comúnmente descritos en ratones viejos APP y en otros modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Janus y Westaway, 2001; Giménez-Llort et al., 2007). Se sabe también que los estímulos estresantes conducen al aumento de actividad del eje HHA y la consiguiente cascada glucocorticoide resultante en el daño hipocampal propuesto por Sapolsky et al. (1986), junto con la disfunción inmunitaria descrita originariamente por Selye (1975) como una de las tres características del síndrome general de adaptación empleado para definir el concepto de estrés. De hecho, la desregulación de la respuesta al estrés del eje HHA es otra característica de la AD a nivel neuroendocrino (Maeda et al., 1991; Hatzinger et al., 1995). También, se ha descrito una hiperactividad del eje HHA dependiente de sexo y edad en el modelo de ratón TgCRN8 (Touma et al., 2004), y una mayor sensibilidad a factores fisiológicos estresantes asociada con alteraciones con la función HHA en ratones transgénicos que expresan una forma mutante de APP humana (Pedersen et al., 1999).

En el modelo animal transgénico empleado en el presente trabajo también se ha observado la falta de habilidad para afrontar situaciones de estrés moderado, como puede ser la novedad, a distintas edades, lo que mimetiza algunos de los síntomas comportamentales y psicológicos de demencia descritos en pacientes humanos con AD (Giménez-Llort et al., 2006; 2007). A la edad de 15 meses, la misma empleada en el presente trabajo, en que los animales 3xTgAD han desarrollado placas extracelulares de A β y agregados neurofibrilares de tau, la neofobia, medida como conducta de inmovilidad en el campo abierto, es mayor en los viejos 3xTgAD, y especialmente en los machos, que en los viejos y en los adultos NTg. También, la latencia al inicio de conductas de acicalamiento en esa misma prueba se encuentra retrasada tanto en hembras como en machos viejos 3xTgAD cuando se comparan con los animales NTg de su misma edad y sexo, lo que implica una pérdida de control del entorno (Giménez-Llort et al., 2008). Éstos son algunos ejemplos de que en efecto, las conductas que muestran los animales viejos 3xTgAD, y especialmente los machos, son similares a los síntomas comportamentales y psicológicos de demencia descritos en pacientes humanos de AD, con habilidades impedidas para afrontar situaciones de estrés moderado como es un campo abierto nuevo e iluminado.

La hormona cortisol/corticosterona se encuentra inversamente relacionada con las conductas de riesgo (Mazur, 1995), siendo éstas rasgos más frecuentes en los machos que en las hembras (Rosenblitt et al., 2001). Esto concuerda con el hecho descrito en la literatura científica acerca de niveles considerablemente aumentados de esta hormona en las

hembras que en los machos adultos (Atkinson y Waddell, 1997; Stefanski y Grüner, 2006), y mostrados también en nuestros resultados, donde puede observarse que las hembras NTg adultas muestran 6 veces los niveles de corticosterona plasmáticos de los machos de la misma edad. Los niveles de hormona disminuyen con la edad únicamente en hembras, mientras que parecen encontrarse menos alterados en los machos, lo que está de acuerdo con estudios previos realizados en humano (Walston y Fried, 1999; Zietz et al., 2001). No obstante, el dimorfismo sexual en la vejez se mantiene, aunque se atenúa, mostrando las hembras NTg viejas unos niveles 2 veces superiores a los de los machos.

Por otra parte, algunos autores han descrito niveles similares de cortisol plasmático en hombres y mujeres con Alzheimer, niveles que se encontraban aumentados con respecto a la población sana de la misma edad (Rasmuson et al., 2002). No obstante, en estudios previos realizados en ratones 3xTgAD, Clinton et al. (2007) observaron un dimorfismo sexual en la cognición y la respuesta a estrés dependiente de la edad. Además, las hembras 3xTgAD jóvenes muestran una respuesta marcadamente intensificada de corticosterona después de 5 días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris en comparación con los machos 3xTgAD de la misma edad, diferencias que desaparecen en animales más viejos (Clinton et al., 2007). Los nuevos resultados descritos en la presente tesis pueden ayudar a aclarar este fenómeno. En los ratones NTg, las diferencias sexuales persisten a lo largo del envejecimiento, con niveles plasmáticos de corticosterona aumentados en las hembras tanto en la vejez como en edades más jóvenes. Sin embargo, estas diferencias sexuales no existen en los ratones viejos 3xTgAD, lo que concuerda con la observación de Clinton et al. (2007). No obstante, cuando estos ratones viejos 3xTgAD se comparan con animales NTg de la misma edad y sexo, los resultados revelan una ausencia de diferencias entre las hembras pero un aumento significativo de la corticosterona plasmática en los machos viejos 3xTgAD en relación a los NTg, lo que sugiere que probablemente una activación intensificada del eje HHA se encuentra en la base, o al menos relacionada, con las alteraciones inmunológicas descritas en la presente tesis así como en las conductuales observadas con anterioridad (Giménez-Llort et al., 2008) en estos machos viejos 3xTgAD.

Además, no podemos olvidar que el efecto de los glucocorticoides se encuentra aumentado o disminuido con el envejecimiento según los tipos celulares que se consideren (Landfield et al., 2007), que varían no sólo con la edad sino que también pueden hacerlo en la patología de Alzheimer (Speciale et al., 2007). De este modo, una ausencia de variaciones

en los niveles plasmáticos de corticosterona entre las hembras viejas NTg y 3xTgAD no descarta que esta hormona no contribuya al desarrollo de la patología también en este sexo.

Los presentes resultados tienen especial relevancia si se tiene en cuenta que las **alteraciones inmunitarias sistémicas**, en cuanto a la desregulación general de las respuestas inmunológicas a agentes estimulantes, que muestran los enfermos de Alzheimer podrían ser no sólo el reflejo de un epifenómeno del cerebro, sino estar causalmente relacionadas con la patología y contribuir a su desarrollo a nivel central exacerbando la alteración glial. Recordemos que las áreas cerebrales más afectadas con el envejecimiento y el Alzheimer, como la corteza entorrinal, son similares en ambos procesos, pero el deterioro es mayor y más acelerado en enfermos de Alzheimer en relación a los sujetos sanos de la misma edad (Small et al., 2000). Por otra parte, los resultados descritos aquí y otros previamente publicados por nosotros (Giménez-Llort et al., 2008) muestran que la inmunosenescencia sistémica y el deterioro de la red neuroinmunoendocrina que se da con la edad se encuentra acelerada y más pronunciada en los triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer. Se ha propuesto que la inflamación crónica asociada al envejecimiento y los consecuentes niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias a nivel periférico pueden intensificar la activación por parte de la glia a nivel central, resultando en la neuroinflamación que se encuentra en la base del deterioro cognitivo con la edad y del Alzheimer (von Bernhardi, 2007). También, hay que considerar que los linfocitos T circulantes alterados en su funcionalidad son capaces de penetrar en el parénquima cerebral y contribuir en la patogénesis de dicha enfermedad (Marx et al., 1998), pero también algunos autores han apuntado ya acerca del posible impacto de la acumulación progresiva de linfocitos T a lo largo del envejecimiento normal en áreas cerebrales sobre el progresivo declive cognitivo con la edad (Stichel y Luebbert, 2007). Por otra parte, la alteración en la funcionalidad de las células inmunitarias podría verse agravada por la desregulación que se produce en hormonas como los **glucocorticoides** procedentes del eje HHA, mostrada en el presente trabajo, de modo que podría producirse un círculo vicioso difícil de interceptar.

En **conclusión**, aunque la prevalencia de la enfermedad es mayor en hembras, la mayor vulnerabilidad de la red neuroinmunoendocrina en machos podría resultar en una mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos del envejecimiento y ser responsable de la mayor morbilidad y mortalidad observada en los machos 3xTgAD. Por tanto, las estrategias que mejoren el sistema neuroinmunoendocrino pueden tener efectos

preventivos y/o terapéuticos prometedores sobre la enfermedad. Los resultados descritos aquí también sugieren la importancia de las diferencias en función del sexo, que deberían ser consideradas tanto en investigación básica como en la clínica para el estudio de nuevas estrategias con objeto de frenar la enfermedad de Alzheimer.

5.2. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA EN EL ENVEJECIMIENTO.

5.2.1. La suplementación con antioxidantes: Efecto de la N-acetilcisteína sobre la funcionalidad y el estado redox de los leucocitos de sangre periférica en mujeres postmenopáusicas.

Los resultados descritos en este subobjetivo de la presente tesis demuestran que la suplementación con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (600 mg/día) a mujeres postmenopáusicas de 50-69 años (que constituye uno de los grupos experimentales) y mayores de 69 (el otro grupo experimental), incluso por un periodo relativamente corto, como pueden ser 2 meses, es capaz de mejorar significativamente importantes funciones de los linfocitos y neutrófilos así como los niveles de citoquinas, que sufren alteraciones asociadas al envejecimiento, aproximando sus valores a los mostrados por mujeres adultas sanas, y ejerciendo por tanto un efecto modulador y no meramente estimulador sobre el sistema inmunológico. Estos efectos fueron más significativos en el grupo de mujeres mayores de 69 años, esto es, con un estado más avanzado de su proceso de envejecimiento y en las que los niveles de funcionalidad inmunológica de partida eran peores que los observados en el grupo de 50-69 años. Estos resultados confirman datos previos obtenidos con este antioxidante por nuestro grupo de investigación en ratones biológicamente viejos (Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2005a). Es más, la NAC es eficaz aumentando el contenido intracelular de GSH, disminuido en los leucocitos de las mujeres postmenopáusicas, sin cambios en los niveles plasmáticos, mientras que disminuye las concentraciones de MDA en plasma, que se encuentran aumentadas con la edad. En general, los efectos beneficiosos de la NAC en mujeres postmenopáusicas se observan ya tras 2 meses de administración, siendo más evidentes con 4 meses, y se prolongan, al menos en parte, 3 meses después de haber finalizado dicha administración.

En primer lugar, se discutirán brevemente los cambios inmunitarios observados en las **mujeres postmenopáusicas** en relación a las jóvenes de 30-49 años.

Ya se ha comentado con anterioridad que la desregulación y el declive que se producen en la inmunidad de los individuos que se encuentran inmersos en el proceso de envejecimiento, quedan evidenciados por el mayor riesgo y gravedad de las infecciones así como por la mayor susceptibilidad al cáncer que aparecen al avanzar la edad (Miller, 1996; Castle, 2000).

En lo referente a los cambios asociados con el envejecimiento en las **funciones linfocitarias** en humano, muchos estudios confirman que la **respuesta proliferativa** ante antígenos o mitógenos, como el PHA, disminuye a medida que se avanza en el proceso de envejecimiento, lo que es coincidente con el declive en los niveles de **IL-2** (Ginaldi et al., 1999a; 2000; De la Fuente y Víctor, 2000; De la Fuente, 2008b; De la Fuente et al., 2008). Ambos hechos se encuentran en corcondancia con los presentes resultados. Lo que es más, las mujeres postmenopáusicas estudiadas en este trabajo también presentan un deterioro de la **migración** hacia el foco infeccioso por parte de los leucocitos mononucleares, lo que confirma trabajos previos de nuestro grupo de investigación (De la Fuente et al., 2005; 2008).

Además, en los últimos años se está acumulando una gran cantidad de evidencia en relación a la disminución de la **actividad NK** a lo largo del proceso de envejecimiento en humanos (De la Fuente, 2008b; De la Fuente et al., 2005; 2008).

Por otra parte, a pesar de que en el pasado se pensó que los **fagocitos** jugaban un papel poco importante en la disfunción inmunológica que se produce en la vejez, estudios más recientes apuntan al declive general en las actividades funcionales de estas células, incluyendo entre ellas la **fagocitosis** y la **quimiotaxis**, como una de las razones fundamentales que explican la susceptibilidad y la vulnerabilidad a las infecciones bacterianas y virales en individuos de edad avanzada, y éstas sobresalen como las causas más comunes de enfermedad y muerte en la vejez (Ginaldi et al., 1999a; De la Fuente et al., 2004a; 2005; 2008).

Sin embargo, la **adherencia** de los leucocitos no cambió en las mujeres postmenopáusicas con respecto a las jóvenes, mientras que trabajos previos de nuestro grupo de investigación mostraron un aumento de la misma en hombres y mujeres de edad avanzada (De la Fuente et al., 2008). Esta discrepancia podría deberse al hecho de que el grupo de controles adultos empleado por De la Fuente et al. (2008) era más joven que el usado en el presente trabajo. La adherencia de los leucocitos es uno de los primeros eventos que se suceden en las respuestas inmunitaria e inflamatoria, precediendo a la

migración hacia el foco de infección, y es especialmente sensible al estrés oxidativo, viéndose estimulado por los radicales libres (De la Fuente y Víctor, 2000). Por esta razón, los cambios asociados a la edad en esta función podrían producirse en etapas tempranas del proceso de envejecimiento, lo que habría conducido a la ausencia de diferencias encontrada en el presente trabajo.

No obstante, los resultados de este estudio sí que muestran que otros parámetros inmunitarios, también íntimamente relacionados con el estrés oxidativo e inflamatorio que afecta a las células, se encuentran aumentados en las mujeres mayores, esto es, los niveles basales y estimulados de **anión superóxido** en neutrófilos, cuyo exceso podría resultar perjudicial para las propias células inmunitarias y para las células y tejidos vecinos, y los de **TNF- α** en cultivos de sangre total en respuesta a LPS, lo que está de acuerdo con varios estudios previos (De la Fuente, 2008b).

Por último, en lo referente a la **IL-8**, se han descrito niveles aumentados de esta quimioquina en ensayos basales de sangre total procedente de individuos ancianos, sin apreciarse diferencias al compararlos con la de adultos bajo condiciones de estimulación por LPS (Gabriel et al., 2002), lo que está de acuerdo con los resultados descritos en el presente trabajo. No obstante, la IL-8 es una citoquina temprana y por ello, al igual que lo mencionado anteriormente en el caso de la adherencia leucocitaria, los cambios en sus niveles con la edad podrían producirse de manera temprana en la vida. Para confirmar estas hipótesis, se hacen necesarios futuros estudios que consideren controles adultos más jóvenes.

Como ya se ha venido comentando, dado que el **GSH** es el principal agente neutralizador de especies reactivas de oxígeno y ciertas funciones inmunitarias son especialmente sensibles a éstas, incluso una depleción moderada del contenido intracelular del GSH tiene importantes consecuencias para una variedad de funciones leucocitarias, siendo especialmente sensibles las dependientes de IL-2, tales como la proliferación de los linfocitos T y la actividad NK (Dröge et al., 1994).

Los presentes resultados dejan en evidencia que los niveles de glutatión, tanto plasmáticos como los presentes en linfocitos y neutrófilos, disminuyen en mujeres mayores de 50 años en relación a los presentes en las mujeres de menor edad (30-49 años). Hay una serie de trabajos en humano en los que se han detectado cambios en los niveles de glutatión con la edad. Prácticamente todos ellos se han basado en medidas en sangre total, eritrocitos, suero o plasma y, aunque se han encontrado resultados contradictorios, una

mayoría detecta menores niveles de glutathione en los sujetos ancianos en relación a los jóvenes (Yang et al., 1995). En otros estudios realizados en plasma se ha observado que el declive dramático y rápido del sistema antioxidante del glutathione es alrededor de la década de los 50 (Jones et al., 2002). También se ha descrito una disminución con la edad en las concentraciones de glutathione presentes en linfocitos, encontrándose éstas, en los individuos de 60-80 años, por debajo de la mitad de las detectadas en estas células de sujetos de 20-40 años (van Lieshout y Peters, 1998). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran cómo la disminución en los niveles de glutathione, tanto plasmático como intraleucocitario, se observa ya en las mujeres postmenopáusicas de 50-69 años, manteniéndose en mujeres mayores de 69. Estos datos revelan, por tanto, un declive dramático de los niveles de glutathione coincidente con la pérdida de la actividad estrogénica, lo que parece corroborar el hecho descrito por otros autores de que la unión de los estrógenos con sus receptores da lugar al aumento en la expresión de genes asociados con una mayor esperanza de vida, entre los que se encuentran aquéllos que codifican para ciertas enzimas antioxidantes como las implicadas en la cinética del glutathione (Viña et al., 2005).

El hecho de que los linfocitos de las mujeres que superan los 69 años muestren unos niveles mayores de glutathione que las de 50-69 podría ser resultado del tipo de colectivos utilizados en el estudio. Así, mientras el grupo de mujeres de 50-69 años fue tomado casi exclusivamente de las trabajadoras del Hospital Clínico San Carlos, pudiendo éstas sufrir unos niveles de estrés, horas de sueño o hábitos alimenticios y de vida, incluyendo el tabaquismo, diferentes al resto de la población general de esa edad, las mujeres de más de 69 fueron obtenidas de las usuarias del Servicio de Geriatria del mismo Hospital, concretamente del Programa “Envejecer con éxito”. Esta especial condición junto con los criterios rigurosos de selección empleados, y que obligaron a rechazar a muchas de las potenciales participantes, ha conducido a que este grupo de mujeres ancianas probablemente sea un colectivo que goce de un estado de salud superior al de la población general de mujeres de su misma edad. Dada esta limitación de nuestro estudio, sería muy interesante llevarlo a cabo en un futuro en una población más variada y menos seleccionada de individuos. Así, con el fin de obtener una muestra lo más cercana posible a la población general, se debería sacrificar ciertos criterios de exclusión a la hora de obtener el colectivo a estudiar.

También, esos mayores niveles de glutathione en los linfocitos de las mujeres que superan los 69 años, hecho que no sucede en neutrófilos, parecen estar mostrando una homeostasis más preservada en el primer tipo de células que en el segundo. Los linfocitos podrían ser capaces de producir más cantidad de glutathione o conservar mejor este antioxidante ante el mayor estrés oxidativo que se sabe aparece al avanzar la edad (De la Fuente et al., 2005), y que queda demostrado en los presentes resultados a través del aumento en los niveles de anión superóxido en neutrófilos y de **MDA** en plasma, éste último habiendo sido descrito con anterioridad como predictor de mortalidad en individuos humanos ancianos (Huerta et al., 2006). Es un hecho, que ya ha sido comprobado en otros modelos experimentales, que los linfocitos de determinadas localizaciones aumentan sus niveles de glutathione reducido ante una situación de estrés oxidativo como es una endotoxemia (Víctor et al., 2002). También, datos previos de nuestro laboratorio han comprobado que los linfocitos mantienen mejor los niveles intracelulares de glutathione que los fagocitos ante dicho estrés oxidativo (Víctor et al., 2003a).

El presente estudio también demuestra que la administración de **NAC** tiene como resultado el aumento del **glutathione** intracelular presente en los leucocitos circulantes sin afectarse en absoluto los niveles plasmáticos. Incluso administraciones por un periodo relativamente corto de tiempo, como puede ser 2 meses, tienen este efecto beneficioso en el sentido de aumentar los niveles de glutathione leucocitario. Los linfocitos de las mujeres mayores de 69 años son una excepción, al no manifestar en ese periodo ningún efecto, pero hay que considerar que esas células a esa edad son las que presentaban mayores niveles basales. Cuando el tiempo de administración de **NAC** es de 4 meses, el efecto es claramente manifiesto en los dos tipos de leucocitos y a las dos edades analizadas. Además, tal efecto es duradero, puesto que se sigue manteniendo 3 meses después de haberse finalizado el tratamiento.

Algunos autores han afirmado que los cambios en el estado redox que se producen con la edad son reversibles (Jones et al., 2002). De esta forma, podrían llevarse a cabo intervenciones nutricionales o terapéuticas para intentar restaurar dicho estado redox. Dado que, como anteriormente se ha indicado, el glutathione no penetra fácilmente al interior celular (Puri y Meister, 1983; Lenton et al., 2000), su administración directa únicamente intervendría de forma importante en el mantenimiento del estado redox del plasma. Por tanto, deben emplearse estrategias alternativas, como la provisión de aminoácidos precursores (Anderson y Luo, 1998) y/o de agentes inductores de las enzimas de la síntesis

del mismo (Dhakshinamoorthy et al., 2000). Sin embargo, el aminoácido cisteína se oxida fácilmente, siendo bastante inestable y presentando algunas de sus formas dificultad de absorción y transporte al interior celular (Dröge, 2005). La mayor parte de células y tejidos sólo presentan alta actividad de transporte para la forma reducida de la cisteína, por lo que una suplementación eficaz de la misma es a través de la administración del derivado estable NAC (Dröge, 2005).

La NAC, no sólo es un precursor efectivo de la síntesis intracelular de glutathione (De Flora et al., 1991), también puede estimular la actividad de enzimas citosólicas implicadas en el ciclo del glutathione, como la glutathione reductasa, que aumenta la tasa de regeneración del glutathione (Banachlocha, 2001), e incluso actuar de forma directa como antioxidante mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno a través de su grupo tiol (Gressier et al., 1994).

De nuestros resultados se puede deducir que el efecto beneficioso de la NAC sobre la función inmunitaria, que se comentará con detalle más adelante, se puede realizar de forma importante a través del aumento de las reservas de glutathione. Por otra parte, a pesar de que éstas aumentan de forma muy significativa con la administración de NAC en mujeres de 50-69 y en las de más de 69 años, no llegan al nivel de las más jóvenes, lo que puede estar mostrando una menor actividad y/o expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de glutathione a partir de la NAC al envejecer (Liu et al., 2004). Dado que los efectos parecen acumulativos, ya que aumentan con el tiempo, sería interesante conocer el efecto de la administración de NAC durante un periodo más largo. No creemos que un aumento de la dosis fuera una mejor alternativa, puesto que se sabe que los antioxidantes tienen sus mejores efectos en un rango de concentración, que una vez superado puede ser inefectivo (Puerto et al., 2002).

La administración de **NAC** ha demostrado ser una estrategia eficaz para potenciar las **defensas inmunitarias** cuando existe evidencia diagnóstica de deficiencia en glutathione o en cisteína. Así, Breitkreutz et al. (2000) mostraron, en dos estudios randomizados y controlados con placebo, que la administración de NAC a pacientes infectados con VIH, los cuales se sabe presentan niveles anormalmente bajos de cisteína y glutathione (Dröge et al., 1988), conduce a una mejora significativa de ciertas funciones inmunológicas, incluyendo la proliferación de linfocitos T inducida por antígeno, y la actividad NK llegándose a alcanzar niveles próximos a la normalidad. Otros autores (Herzenberg et al., 1997) han descrito una mejora significativa de la tasa de supervivencia a dos años en estos

pacientes después de ser tratados con NAC, aunque la aceptación general de este estudio se ve comprometida por la ausencia de randomización rigurosa.

En este sentido, es importante considerar que algunos autores han descrito el proceso de envejecimiento como un síndrome de deficiencia en glutatión o en cisteína (Dröge, 2005). De acuerdo con esto, Breithaupt et al. (1996) encontraron que la administración de NAC a monos rhesus viejos es capaz de restaurar la **respuesta mitogénica** disminuida y la síntesis de **IL-2** por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+, procesos que requieren de niveles adecuados de glutatión (Dröge et al., 1994). Los presentes resultados demuestran que la suplementación con NAC a mujeres de mayores mejora eficazmente el declive asociado a la edad en la linfoproliferación estimulada por PHA, en los niveles de IL-2 así como en la **actividad NK**, funciones todas ellas que, como ya se ha comentado se deterioran de manera clara en el envejecimiento (Ginaldi et al., 1999a; 2000; De la Fuente y Víctor, 2000; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2008b; De la Fuente et al., 2008).

Es más, el presente trabajo muestra que el tratamiento con NAC disminuye los niveles aumentados de **TNF- α** que se producen con la edad en respuesta a LPS en los ensayos empleando sangre total. Esto concuerda con algunos estudios anteriores al nuestro, que muestran cómo la suplementación con cisteína previene totalmente del aumento en la concentración de TNF- α plasmático en individuos ancianos frágiles sometidos a ejercicio físico (Hauer et al., 2003). Se sabe que el TNF- α se encuentra inducido por el factor de transcripción NF κ B y por consiguiente se expresa bajo condiciones oxidativas (Dröge, 2002a). En este sentido, se ha visto que el NF κ B se inhibe por antioxidantes como la NAC, que de esta forma previenen del exceso de niveles de TNF- α y en consecuencia de una excesiva inflamación que podría llegar a ser mortal en modelos de choque endotóxico (Víctor y De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003a).

También de acuerdo con esta idea, el presente estudio muestra que la suplementación con NAC disminuye los niveles de radical **superóxido**, los cuales aparecen aumentados en los neutrófilos de las mujeres postmenopáusicas, y lo hace tanto en condiciones basales como estimuladas. Otros autores también han encontrado un menor estallido respiratorio de los neutrófilos, en respuesta a diferentes agentes, en voluntarios sanos tras una administración de NAC durante 14 días y a la misma dosis (600 mg/día) que la empleada en el presente trabajo (Urban et al., 1997; Sadowska et al., 2006). Aunque, como ya se ha comentado con anterioridad, existe evidencia de correlación positiva entre

unos niveles bajos de anión superóxido y una mayor actividad bactericida por parte de las células inmunitarias (Boxer, 1995), se hacen necesarios futuros trabajos que estudien la capacidad bactericida de los neutrófilos tanto a lo largo del envejecimiento como después de la administración de NAC.

Por otra parte, la disminución en el estado de oxidación de las mujeres de edad avanzada después del tratamiento con NAC se ve confirmada en el presente trabajo a través de la disminución de los niveles de **MDA** plasmático. En este aspecto, a pesar de que el nivel de MDA en plasma determinado tras la derivatización con TBA seguida de separación mediante HPLC, de manera similar al procedimiento empleado en el presente trabajo, ha sido previamente descrito como un buen marcador de estrés oxidativo (Nielsen et al., 1997), las elevadas temperaturas que se requieren para la derivatización parecen catalizar la formación de artefactos que conducen a sobrevalorar la concentración de MDA (Fenaille et al., 2001). No obstante, por otra parte, el presente trabajo puede estar infravalorando la cadena peroxidativa al medir únicamente el eslabón último de la misma. Por tanto, sería aconsejable confirmar el presente resultado en futuros estudios empleando métodos alternativos que usen condiciones de derivatización más suaves.

Además, la producción de moléculas de **adhesión** y quimioatrayentes de neutrófilos, como la **IL-8**, podría ser regulada a la baja gracias a la NAC a través de la menor activación del NF κ B y generación de radicales libres por parte de los fagocitos (Collins, 1993). Los presentes resultados muestran que la disminución adecuada de la adherencia de los leucocitos coincide además con un subsecuente aumento de la **función quimiotáctica** por parte de las células inmunitarias, a pesar de la disminución en los niveles de IL-8 inducidos por LPS, en las mujeres postmenopáusicas tratadas con NAC. Esto se traduce en que los neutrófilos serían capaces de migrar al foco de infección de manera más efectiva en presencia de menor señal. Estos hallazgos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo de investigación que muestran que la suplementación con la dosis adecuada de NAC a ratones prematuramente envejecidos conduce a una reducción de la adherencia y una potenciación de la quimiotaxis tanto de los linfocitos como de los fagocitos peritoneales (Puerto et al., 2002).

En el mismo estudio, Puerto et al. (2002) describieron una mejora de la **actividad fagocítica** de los macrófagos peritoneales procedentes de animales prematuramente envejecidos, hecho que concuerda con los resultados del presente trabajo en neutrófilos periféricos. Por otra parte, estudios previos *in vivo* con voluntarios humanos sanos (NAC

600 mg/día) también demostraron efectos beneficiosos sobre la fagocitosis de neutrófilos (Urban et al., 1997).

En **conclusión**, se podría deducir de los resultados del presente estudio que la disminución en los niveles de glutatión de las células inmunitarias con la edad es una causa, posiblemente de las más relevantes, del deterioro funcional que experimentan dichas células y que conduce al individuo a padecer con mayor frecuencia infecciones severas así como otras afecciones en las que el sistema inmunitario se encuentra implicado, como el cáncer, dando lugar a un aumento en la morbilidad y la mortandad a medida que avanza el proceso de envejecimiento.

Asimismo, la administración de NAC se muestra como una estrategia eficaz, incluso en tratamientos cortos y a edades avanzadas, para aumentar los niveles de glutatión en el interior de los leucocitos, hecho que se evidencia como una de las causas principales de la marcada mejora que se observa en la función inmunitaria tras dicha administración. De esta forma, la NAC podría contribuir de forma importante a mejorar la salud, y por tanto, la calidad de vida de los individuos en la vejez, potenciando la función de sus defensas inmunológicas.

No obstante, no es posible, por el momento, generalizar los resultados obtenidos en el presente estudio. Hay que tener en cuenta que nuestro ensayo se centró exclusivamente en mujeres, con objeto de evitar la posible variabilidad en función del género. Aunque varios estudios no han mostrado diferencias entre hombres y mujeres con respecto a los cambios que se producen en los niveles de glutatión con la edad (van Lieshout y Peters, 1998), se hacen necesarios futuros estudios que incidan en las posibles diferencias por género, tanto a nivel de las consecuencias del proceso de envejecimiento como de la respuesta a la administración de compuestos antioxidantes como el que nos ocupa. Por otra parte, dada la dificultad que se tuvo para encontrar voluntarias que quisieran participar en el estudio y que cumplieran con rigor los criterios de inclusión planteados, fundamentalmente en el grupo de mujeres de más de 69 años, el número final de participantes fue bastante limitado. Futuras investigaciones aumentando el tamaño muestral serán sin duda de gran interés.

Por último, es importante destacar, como otra conclusión que se extrae de estos resultados, el hecho de que la determinación del glutatión plasmático no es un marcador adecuado para conocer el nivel de este antioxidante en el organismo. Así, el GSH plasmático puede no relacionarse con el que está presente en otras localizaciones, como

son los leucocitos circulantes, sin duda una muestra con significado biológico mucho más relevante que el plasma. Dada la generalizada utilización de plasma en las analíticas que se llevan a cabo para determinar nuestro estado de salud, habría que ser más críticos con las conclusiones que se hacen, en relación a ciertos parámetros, tomando como base únicamente los resultados obtenidos en muestras plasmáticas.

5.2.2. Intervención psicológica: Ambiente enriquecido.

5.2.2.1. Efecto del ambiente enriquecido en el deterioro inmunitario, conductual y cerebral asociado a la edad, en ratones hembras ICR/CD1 adultos y viejos. Incidencia sobre la longevidad.

El enriquecimiento ambiental supone una aproximación experimental en modelos animales al mantenimiento de una vida social, intelectual y física activa en humanos. Son muchos los estudios que han demostrado los beneficios del enriquecimiento ambiental a lo largo del envejecimiento sobre el deterioro neurológico, cognitivo y conductual que se produce con la edad (Mattson et al., 2001; Fernández-Teruel et al., 2002; Segovia et al., 2006; 2009; Mora et al., 2007). También, algunos autores han sugerido que la mejora en estos parámetros puede estar mediada, al menos en parte, por una disminución en los niveles de estrés oxidativo cerebrales (Fernández et al., 2004). Dada la comunicación entre los sistemas nervioso e inmunológico, y el deterioro de la misma con el envejecimiento, nos planteamos si la mejoría que produce el enriquecimiento ambiental a nivel del sistema nervioso, podría tener también un impacto positivo sobre la comunicación entre ambos sistemas, y por tanto, mejorar la funcionalidad del sistema inmunitario. El presente estudio es el primero en describir los efectos de un ambiente enriquecido iniciado a distintas edades, esto es, en la etapa adulta, y cuando los ratones son viejos o muy viejos, sobre la funcionalidad y el estado oxidativo de los leucocitos.

El **enriquecimiento ambiental** utilizado consistió en un iglú permanente y varios objetos de diversas texturas y colores que se intercambiaban cada 2 días. Nuestros resultados confirman los de otros autores respecto a los positivos efectos que tiene el enriquecimiento ambiental (5-8 semanas) a nivel conductual (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Roy et al., 2001; Fernández-Teruel et al., 2002; Meshi et al., 2006). La exposición a este ambiente (8-16 semanas) estimuló la funcionalidad y disminuyó el estrés

oxidativo de las células del sistema inmunitario. También, el estudio de neuroimagen pone de manifiesto una tendencia clara hacia menor atrofia cerebral y mayores valores de T2 en los animales enriquecidos (16-18 semanas) que en los controles, fundamentalmente en la zona más afectada en los ratones viejos, como es el hipocampo, y en aquélla que aparece más afectada en longevos, la corteza somatosensorial. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores acerca de la mejoría que produce el enriquecimiento ambiental a nivel del deterioro cognitivo asociado a la edad (Mattson et al., 2001; Segovia et al., 2006; 2009; Mora et al., 2007).

Son los animales de edades más avanzadas los que se ven más beneficiados ante este enriquecimiento ambiental, lo que en principio podría parecer sorprendente, ya que el deterioro asociado a la edad es mayor precisamente en estos sujetos. Sin embargo, este resultado está de acuerdo con otros previos obtenidos en estudios realizados por nuestro grupo de investigación, en los cuales se utilizó otra estrategia para mejorar la respuesta conductual y la funcionalidad inmunitaria que se encontraban deterioradas por el envejecimiento. Así, la suplementación con antioxidantes ejerció un mayor efecto en aquellos individuos que presentaban un mayor deterioro en los parámetros analizados, por estar más envejecidos (Correa et al., 1999; Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2004; 2005; Álvarez et al., 2006; Alvarado et al., 2006a).

Con respecto al **sistema inmunitario**, **funciones de los fagocitos** como la **quimiotaxis** hacia el foco de infección y la **fagocitosis** de partículas extrañas, que disminuyen con la edad (Niwa et al., 1989; Guayerbas et al., 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003), son potenciadas en los animales enriquecidos, alcanzando los individuos de edad avanzada valores similares a los de los adultos control. Es interesante observar, en el caso de la movilidad hacia el foco infeccioso, que este aumento gracias al ambiente enriquecido se produce incluso en las edades más jóvenes, lo que apoya a este parámetro como buen marcador para detectar tempranamente los efectos de las estrategias utilizadas para contrarrestar la inmunosenescencia.

Por otra parte, a pesar de que no existen cambios marcados en el porcentaje de estimulación de **ROS** intracelulares, los animales enriquecidos muestran globalmente mayores niveles que los controles no enriquecidos. Es obvio que la producción de ROS es un mecanismo esencial para la destrucción de microorganismos patógenos, pero existen evidencias de correlación positiva entre niveles bajos de los mismos y mayor actividad bactericida (Boxer, 1995), e incluso se ha descrito que niveles aumentados de radicales

libres no presentan un efecto paralelo sobre la función bactericida (Wolach et al., 2000). Así, se hacen necesarios futuros estudios que relacionen este discreto aumento en el estímulo de los niveles de ROS con un posible cambio en la actividad bactericida de los leucocitos en los animales enriquecidos. No obstante, es poco probable que pudieran resultar deletéreos para los propios leucocitos o para las células que se encuentren próximas a ellos, puesto que el aumento es poco relevante, pero además las células disponen de mayor contenido en defensas antioxidantes para hacerles frente, lo que haría rápida su neutralización e improbable su escape.

En suma, periodos relativamente cortos de enriquecimiento ambiental podrían disminuir la susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones bacterianas y víricas en la vejez, siendo éstas las causas más comunes de enfermedad y muerte en los individuos de edad avanzada (Ginaldi et al., 1999a; Lord et al., 2001; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2004a; 2005; 2008).

En relación a la **funcionalidad linfocitaria**, la disminución con la edad en la **respuesta proliferativa** de los linfocitos ante antígenos o mitógenos, tales como la **ConA**, que es estímulo para las células T, coincidente con el declive del factor de crecimiento autocrino de células T, la **IL-2** (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008b), es revertida gracias a la exposición a un ambiente enriquecido, alcanzando valores próximos o similares a los de los adultos control, lo que podría estar relacionado con la potenciación de los niveles de dicha citoquina que se ha observado en los sobrenadantes de esos mismos cultivos. Recordemos que una función linfoproliferativa inducida por ConA bien conservada es uno de los biomarcadores inmunitarios que constituyen el fenotipo inmunológico de bajo riesgo de morbilidad humano y que se asocia a un buen estado de salud (De la Rosa et al., 2006).

No obstante, el **porcentaje de linfocitos T CD4** disminuyó globalmente en los animales que habían sido expuestos al ambiente enriquecido. Otros autores han descrito disminución del porcentaje de células T CD4 y/o de T CD8, en esplenocitos de ratones machos jóvenes que han vivido en ambientes enriquecidos con respecto a los no enriquecidos (Marashi et al., 2003; 2004). El significado fisiológico de este resultado merece futuras investigaciones, pero dado que los animales gozaban de buena salud y que la respuesta de las células inmunitarias fue en general más adecuada en los enriquecidos que en los no enriquecidos, el menor porcentaje de linfocitos T CD4 no parece suponer un perjuicio para estos animales, sino que podría ser un mecanismo más para alcanzar una

buena homeostasis. Además, según nuestros resultados con respecto a la longevidad, el mejor mantenimiento del cociente CD4/CD8 no sería fundamental para alcanzar el envejecimiento saludable, sino que en este sentido tendría más peso la mejor preservación de la respuesta Th1/Th2.

También, la menor **migración** de los linfocitos hacia el foco de infección en los animales de edad avanzada (Simons y Reynolds, 1990; Fulop et al., 2004; De la Fuente, 2008b), es revertida gracias al enriquecimiento ambiental, llegando a igualar los valores obtenidos en los adultos control.

En suma, el enriquecimiento ambiental potencia la inmunidad celular, que se encuentra marcadamente disminuida en la vejez.

Por otra parte, la menor **actividad NK** que acompaña al proceso de envejecimiento (De la Fuente et al., 2005; 2008; De la Fuente, 2008b) es revertida gracias al ambiente enriquecido, de modo que la función citotóxica en los leucocitos peritoneales de animales de edad avanzada enriquecidos se iguala a la presente en animales jóvenes. Dado que la actividad NK se considera como uno de los marcadores más sensibles en el análisis del sistema neuro-inmuno-endocrino (Fiserová et al., 2002; Mocchegiani y Malavolta, 2004), la mejora de esta función podría ser reflejo de la recuperación de la comunicación neuro-inmuno-endocrina gracias al enriquecimiento ambiental, y por tanto, de la homeostasis y finalmente, la salud. De hecho, una mejora de la actividad NK, junto con unos menores niveles de ansiedad, ha sido previamente descrita en ratones machos expuestos a un periodo de 6 semanas de enriquecimiento ambiental (Benaroya-Milshtein et al., 2004).

De esta forma, el ambiente enriquecido podría disminuir la mayor incidencia de infecciones y cáncer en el envejecimiento (Castle, 2000), puesto que estas enfermedades se encuentran relacionadas directamente con la funcionalidad de los leucocitos, y más concretamente con la actividad citotóxica natural en el caso de procesos víricos y tumorales.

Con respecto a la expresión de **TLRs** en los leucocitos peritoneales, cabe destacar que el aumento en la expresión de TLR-2 y TLR-4 en las células T **CD4** y T **CD8** de los muy viejos con respecto a los adultos control, es totalmente revertido en los muy viejos enriquecidos, de modo que estos animales presentan valores idénticos a los de los adultos control. Dado el papel clave de los linfocitos T en procesos inflamatorios crónicos tanto dentro como fuera del sistema nervioso central (Arumugam et al., 2005; Cohen Tervaert, 2009), el enriquecimiento ambiental podría contribuir a un menor desarrollo de

enfermedades asociadas al envejecimiento y, por tanto, a una disminución de la morbilidad en la vejez.

Por otra parte, a pesar de que la expresión de **TLRs** no varía con la edad en las células dendríticas **CD11c**, sí que puede observarse una discreta disminución de la misma en los animales muy viejos enriquecidos con respecto a los controles de su misma edad no enriquecidos, si bien los niveles se mantienen similares a los mostrados por los adultos control. Por tanto, es poco probable que esta discreta disminución tenga una influencia significativa sobre la funcionalidad de estas células.

También, los niveles de **TNF- α inducidos por LPS** bacteriano en los sobrenadantes de cultivo de los leucocitos peritoneales, son mejorados gracias a la exposición de los animales al ambiente enriquecido, de manera que se potenciaría la respuesta inflamatoria ante la infección.

Además, la **proliferación** de los linfocitos ante ese mismo estímulo, el **LPS**, aumenta en los adultos maduros y muy viejos enriquecidos en relación a sus respectivos controles de edad, pero disminuye en los viejos expuestos al ambiente enriquecido con respecto a los viejos control. Un patrón similar encontramos en la expresión de **TLR-2 en los linfocitos B**. La relación entre ambos sucesos así como el resultado fisiológico de ambos es difícil de explicar y merece futuras investigaciones, pero parece claro que un mismo ambiente enriquecido va a tener efectos específicos dependiendo de la edad en que se aplica.

En suma, todo apunta a que los individuos más beneficiados por la exposición a periodos cortos de ambientes enriquecidos, son los de mayor edad. Los adultos también se ven beneficiados, especialmente si el enriquecimiento se prolonga durante toda la vida, lo que tiene un fuerte impacto aumentando la **supervivencia** de los individuos. No obstante, cuando los animales no han vivido en un ambiente enriquecido y éste se inicia en edades intermedias, si bien también se ven globalmente beneficiados, nuestros resultados apuntan a que podrían tardar más en adaptarse al reto que supone el enriquecimiento.

Esta mejora de la respuesta inmunitaria en los individuos que han sido expuestos a un ambiente enriquecido podría estar mediada a través de la disminución en el **estrés oxidativo** crónico que afecta a los leucocitos con el tiempo. En lo que respecta a las defensas antioxidantes, este trabajo muestra que los niveles de **GSH** y las actividades **glutathion peroxidasa** y **catalasa**, que disminuyen en los leucocitos de los ratones viejos en relación a los más jóvenes (Alvarado et al., 2006a; Hernanz et al., 2000; Dröge, 2005;

Alonso-Fernández et al., 2008), se ven potenciados muy significativamente **gracias al** enriquecimiento ambiental, llegando a igualar o incluso sobrepasar, en el caso de la actividad de la enzima catalasa, los valores encontrados en los más jóvenes. Esto último es interesante si recordamos el papel clave de la actividad de la enzima antioxidante catalasa en la longevidad (Alonso-Fernández et al., 2008).

La recuperación de las reservas intracelulares de glutatión y potenciación de su ciclo **gracias al** enriquecimiento ambiental podría encontrarse en la base de la mejora de las funciones que dependen de IL-2, tales como la proliferación de los linfocitos T y la actividad NK, que son especialmente sensibles a la disminución del glutatión (Dröge et al., 1994). Además, algunos autores han indicado que un enriquecimiento ambiental de 8 semanas es capaz de aumentar el contenido cerebral de glutatión en ratas viejas, lo que podría encontrarse en la base de su mejora conductual y cognitiva (Fernández et al., 2004), y concuerda con lo que sucede en los leucocitos, según nuestros resultados.

Por otra parte, este aumento en las defensas antioxidantes de los leucocitos de los sujetos de edad avanzada sometidos al ambiente enriquecido en comparación con los controles de su misma edad es coincidente con la disminución en **marcadores de oxidación**, en lo que al contenido en **glutatión oxidado** y a la **actividad** basal de **xantina oxidasa** se refiere, que recordemos aumentaban con la edad (Alvarado et al., 2006a; Aranda et al., 2007). De nuevo, los marcadores de oxidación en los leucocitos de los viejos enriquecidos alcanzan valores similares a los encontrados en las células de los adultos control. Llama la atención la marcada disminución de los niveles intracelulares de glutatión oxidado en los adultos maduros enriquecidos en comparación con los animales control de su misma edad, lo que sugiere que los animales pueden beneficiarse en algunos aspectos de la exposición al enriquecimiento ambiental incluso en etapas tempranas del envejecimiento.

En conjunto, los sujetos enriquecidos muestran menor estrés oxidativo en sus leucocitos que los no enriquecidos, de modo que la exposición relativamente corta a un enriquecimiento ambiental conduce a un aumento en las defensas antioxidantes y a una disminución en los compuestos oxidantes de estas células, aproximando los valores de ambos en viejos a los presentes en animales jóvenes control. Esta disminución en el estrés oxidativo leucocitario en los animales enriquecidos podría estar relacionada con la mejor respuesta funcional de estas células.

Por otra parte, el estudio de **imagen por resonancia magnética cerebral** pone de manifiesto una tendencia clara hacia menor atrofia en los animales enriquecidos que en los

controles, fundamentalmente en la zona más afectada en los ratones viejos, como es el hipocampo, y en aquélla que aparece más afectada en longevos, la corteza somatosensorial. La disminución de T2 en la corteza entorrinal del hipocampo de las muy viejas control con respecto a edades más jóvenes, es revertida por el ambiente enriquecido. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores acerca de la mejora que produce el ambiente enriquecido en el deterioro cognitivo asociado a la edad (Mattson et al., 2001; Segovia et al., 2006; 2009; Mora et al., 2007), puesto que podrían relacionarse con una mejoría de las habilidades de aprendizaje y memoria, y disminución de la probabilidad de padecer demencias, como la de tipo Alzheimer.

Con respecto al **declive conductual** a lo largo de la edad, los animales muy viejos mostraron una **actividad motora** disminuida en comparación con los animales control más jóvenes, lo que se vio reflejado en esa actividad en el tablero de agujeros, en el campo abierto y en el laberinto elevado en cruz, así como en un menor tiempo de latencia a la primera flotación en el test de Porsolt. Es probable que una disfunción cerebelar se encuentre en la base de esta marcada reducción en la actividad vertical (Forster et al., 1996). Tampoco podemos olvidar el deterioro neuromuscular y la sarcopenia que se producen con el envejecimiento (Edström et al., 2007). En concreto, el tablero de agujeros proporciona medidas independientes de actividad motora general (deambulación externa y postura erguida) y de exploración dirigida (frecuencia exploratoria) (File, 1992), que se encuentran frecuentemente disociadas al aplicar diversos tipos de tratamientos. Nuestros resultados apoyan esta idea e indican que los efectos de la edad así como de la condición ambiental se hacen sólo evidentes en aquéllos parámetros relacionados con la actividad motora general.

Los animales viejos parecen beneficiarse más del enriquecimiento en relación a la actividad motora, puesto que los efectos más significativos se observan a ese nivel en el tablero de agujeros y en el laberinto elevado en cruz, mientras que los muy viejos lo harían en mayor medida cuando se consideran las **respuestas emocionales** en este último y en el test de Porsolt.

De acuerdo con la interpretación clásica del laberinto elevado en cruz, una disminución en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos es indicativa de mayor **ansiedad**. Desde este punto de vista, nuestros resultados contrastarían con estudios previos que han descrito una disminución de la ansiedad gracias al ambiente enriquecido (Fox et al., 2006), pero estarían de acuerdo con otros autores que también han observado un aumento de la conducta relacionada con la ansiedad en los ratones enriquecidos en esta

prueba en concreto (Zhu et al., 2006). No obstante, existe otra posible interpretación de estos resultados, de manera que el menor porcentaje de tiempo y entradas en los brazos abiertos de los animales enriquecidos podría reflejar una menor búsqueda de **novedad** resultado de la abundante estimulación sensorial en sus condiciones de estabulación. Esta perspectiva del laberinto elevado en cruz merece futuros estudios (Thorsell et al., 2006).

En el test de Porsolt, que supone una situación de la que no se puede escapar, la conducta de *climbing* fue menor en los animales enriquecidos, lo que podría considerarse como una conducta adaptativa, ya que resulta en un menor gasto energético. El hecho de que la reducción en las respuestas de escape aparece ya en el primer día del test podría ser indicativo de una mayor **capacidad de aprendizaje** para enfrentarse a la situación estresante.

En **conclusión**, la exposición a un ambiente enriquecido durante periodos relativamente cortos, de 5-8 semanas y de 8-16 semanas, produce una marcada mejora de los parámetros de conducta y de función inmunitaria, respectivamente, los cuales se deterioran con la edad. Esta mejoría es más marcada en los individuos viejos, en los que el declive asociado a la edad es mayor. Esto es, la exposición a un ambiente rico en actividades intelectuales y/o físicas en la vejez, incluso por periodos cortos, podría resultar muy beneficiosa aumentando la calidad de vida de los individuos de edad avanzada. No obstante, en nuestro estudio, la única estrategia que permitió el aumento de la longevidad de la población, fue la exposición al enriquecimiento ambiental iniciada en etapas tempranas y prolongada hasta el final de la vida. Así, se confirma la importancia de mantener una vida activa tanto mental como físicamente hasta los últimos momentos, y se demuestra además que ésta debe ser establecida durante etapas tempranas para no sólo envejecer de manera más saludable sino también aumentar la esperanza de vida.

5.2.2.2. Efecto del ambiente enriquecido en los cambios asociados a la enfermedad de Alzheimer en la funcionalidad y el contenido en glutathione de linfocitos esplénicos y tímicos, y en la concentración de corticosterona plasmática, en ratones machos y hembras viejos triple-transgénicos para esta enfermedad.

Como ya se ha comentado anteriormente, los cambios en el sistema neuroinmunoendocrino asociados a la edad y a la enfermedad de Alzheimer parecen mostrar ciertas similitudes, que apuntan a una senescencia prematura en los individuos que

padecen esa enfermedad, especialmente en los machos. Por otra parte, las estrategias que promueven la actividad intelectual, física y social, como es el enriquecimiento ambiental, han demostrado sus efectos beneficiosos a lo largo del envejecimiento cronológico; efectos mediados a través de la mejora neuroinmunoendocrina, como ya hemos visto. También, estudios recientes han comprobado el beneficio de un ambiente enriquecido en la reducción del desarrollo de la patología cerebral y en la mejora de la cognición así como de las respuestas conductuales, como por ejemplo aquellas relacionadas con la ansiedad, en diferentes modelos murinos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Mattson et al., 2001; Arendash et al., 2004; Lazarov et al., 2005; Ambrée et al., 2006; Görtz et al., 2008; Laviola et al., 2008). Sin embargo, éste es el primer estudio científico que considera los efectos del enriquecimiento sobre el sistema inmunoendocrino, a nivel de función inmunitaria periférica y niveles plasmáticos de corticosterona, en uno de estos modelos, diferenciando además en función del sexo.

Para ello, empleamos ratones hembras y machos, NTg y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, controles no enriquecidos y con enriquecimiento ambiental. El ambiente enriquecido comenzó en la etapa adulta, a los 6 meses de edad, y se mantuvo durante 5 meses y medio. El **protocolo de estimulación ambiental** fue más largo en este caso que el empleado a lo largo del envejecimiento cronológico, debido a que se ha demostrado que existe un periodo mínimo necesario para inducir efecto (Amaral et al., 2008), que consideramos podía diferir ligeramente entre el envejecimiento cronológico y el modelo de Alzheimer. Por otra parte, por razones técnicas, los animales no pudieron ser sacrificados hasta la edad de 15 meses, es decir, 3 meses y medio tras la finalización del protocolo de enriquecimiento ambiental. En este sentido, se ha observado que el mantenimiento de los efectos, así como la consistencia y magnitud de los mismos, es mayor en los animales que han sido expuestos a periodos más prolongados de enriquecimiento (Amaral et al., 2008). El ambiente enriquecido consistió también en un iglú, que se mantuvo de manera permanente, mientras que otros objetos, de diversos colores y texturas, se intercambiaron cada 2 días, pero dada la gravedad de la patología que nos ocupa, se incluyó una rueda de modo permanente.

Los resultados muestran que los efectos del enriquecimiento ambiental en la función inmunitaria de los animales NTg y 3xTgAD viejos son complejos, apareciendo en muchos parámetros un marcado **dimorfismo sexual**. El grupo de **machos viejos 3xTgAD enriquecidos** es el que se ve claramente **más beneficiado** por la exposición al

ambiente enriquecido y/o en el que los posibles efectos beneficiosos del mismo se han mantenido con mayor consistencia. Recordemos que estos machos viejos 3xTgAD son también los que sufrían los cambios neuroinmunoendocrinos más marcados.

La **quimiotaxis** de las células mononucleares esplénicas y tímicas, que aumentaba con la edad en machos y hembras, y más aún en presencia de la AD en las hembras, disminuye en los animales 3xTgAD enriquecidos, especialmente en los machos, en los que se alcanzan valores incluso por debajo de los animales NTg de la misma edad y sexo.

La **actividad NK** aumenta de manera global gracias al ambiente enriquecido, siendo los linfocitos tímicos de los machos viejos 3xTgAD, cuya función citotóxica en los no enriquecidos se encontraba muy por debajo de los NTg controles, las células en las que encontramos el efecto más relevante, de modo que la función NK se iguala a la de estos últimos.

El enriquecimiento aumenta de manera global la **respuesta proliferativa** de los linfocitos tímicos ante ConA y LPS, y disminuye los niveles de **TNF- α** inducidos por LPS en los cultivos de las células de ambos órganos. Además, la tendencia al aumento de la linfoproliferación inducida por ConA en los machos enriquecidos es coincidente con esa misma tendencia en los niveles de **IL-2** presente en los sobrenadantes de dichos cultivos.

La mejora inmunitaria que se produce en los machos viejos 3xTgAD enriquecidos se corresponde con una disminución de los niveles plasmáticos de **corticosterona** en estos animales hasta alcanzar valores similares a los de los machos viejos NTg. Por tanto, los efectos beneficiosos del ambiente enriquecido sobre el sistema inmunológico de estos individuos podrían estar mediados a través de un control más adecuado del eje HHA. La colaboración en curso con la Dra. Lydia Giménez-Llort nos dirá próximamente si esto se traduce en una mejora de las conductas relacionadas con la ansiedad así como de la cognición, y fundamentalmente, si el enriquecimiento ambiental es capaz de aumentar la baja esperanza de vida de estos individuos.

No obstante, nuestros resultados con respecto al efecto del enriquecimiento sobre la red inmunoendocrina en las **hembras viejas NTg**, en las que ciertas funciones parecen encontrarse más deterioradas con respecto a las hembras de su misma edad y condición no enriquecidas (véase el aumento de la quimiotaxis de linfocitos esplénicos y tímicos, la disminución de la proliferación en respuesta a LPS en células esplénicas y del contenido en glutatión de estas mismas células, y la tendencia al aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona, especialmente en las hembras viejas NTg al comparar las enriquecidas con

respecto a las no enriquecidas), son controvertidos, especialmente si consideramos el claro efecto beneficioso del enriquecimiento ambiental a lo largo del envejecimiento cronológico sobre la conducta y sobre el sistema inmunitario peritoneal de las hembras de la cepa ICR/CD1.

Una posible explicación sería que las hembras son más vulnerables a la retirada del enriquecimiento que los machos. De hecho, podría suceder que la retirada del ambiente enriquecido, lejos de mantener sus efectos beneficiosos en el tiempo, supusiera un estrés crónico, difícil de superar por las hembras sanas. Esto las predispondría a padecer las alteraciones propias de la AD, y concuerda con la mayor prevalencia de la enfermedad en las mujeres que en los hombres ancianos. Si esto es así, nuestros resultados apuntan a que, no sólo es fundamental el mantenimiento de los lazos sociales hasta el final de la vida, como vimos en el estudio acerca del aislamiento en la vejez de las hembras, sino que se hace necesario preservar la actividad intelectual y física hasta las últimas etapas para asegurar un envejecimiento saludable. Se intentará confirmar estas hipótesis en futuras investigaciones añadiendo un punto de estudio coincidente con el fin del protocolo de enriquecimiento.

En **conclusión**, la mayor vulnerabilidad de la red neuroinmunoendocrina en machos 3xTgAD, que podría resultar en una mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos del envejecimiento y ser responsable de la mayor morbilidad y mortalidad observada en estos individuos, podría prevenirse, al menos parcialmente, con el mantenimiento de una vida activa desde la etapa adulta hasta la vejez, incluso si ésta no se mantiene hasta el fallecimiento del individuo, lo que podría conducir a un curso menos agresivo de la enfermedad y una mejora de la calidad de vida de los sujetos. Por otra parte, la mayor susceptibilidad de las hembras a la retirada del ambiente enriquecido en la vejez podría dar lugar a un aumento de la morbilidad y mortalidad en las hembras viejas sometidas a esas circunstancias, y estar relacionada con la mayor prevalencia de trastornos mentales, como la enfermedad de Alzheimer en las mujeres que en los hombres ancianos.

Conclusiones

A continuación se indican las conclusiones que pueden extraerse de la presente tesis.

En relación al primer objetivo, *“Caracterizar ratones viejos y longevos a nivel inmunitario y neurológico”*, puede concluirse que:

1. El estado del sistema inmunitario puede contribuir a retardar o acelerar el proceso de envejecimiento, dado que toda una serie de respuestas funcionales así como de marcadores de estrés oxidativo e inflamatorio, se encuentran preservados en linfocitos y macrófagos peritoneales de ratones longevos, mostrando los de animales viejos un marcado deterioro funcional y un alto grado de estrés oxidativo e inflamatorio. La activación controlada en los leucocitos del factor de transcripción NF κ B, en condición de reposo, se manifiesta crucial en el mantenimiento de ese adecuado estado redox y antiinflamatorio que se asocia a respuestas funcionales preservadas y al alcance de una mayor longevidad, y al cual contribuyen una actividad catalasa y unos niveles de IL-10 fortalecidos.

2. El área cerebral primeramente afectada en los ratones viejos es la corteza entorrinal, mientras que el deterioro cerebral en longevos comienza en la corteza somatosensorial.

3. En los sistemas nervioso e inmunitario, los ratones longevos se muestran altamente resistentes al daño molecular de lípidos y proteínas causado por la oxidación, mientras que los viejos presentan una susceptibilidad lipídica a la oxidación así como una variedad de marcadores de daño oxidativo a proteínas aumentados con respecto a adultos y longevos. Estos niveles de daño a proteínas y los cambios en las actividades quimi tripsina y caspasa del proteasoma 20S parecen no encontrarse directamente relacionados, en lo que a envejecimiento y longevidad se refiere.

Con respecto al segundo gran objetivo de la presente tesis, *“Caracterizar el efecto de las alteraciones neuroendocrinas, en base a la presencia de estrés psicológico crónico, sobre parámetros inmunitarios marcadores de salud y longevidad”*, las conclusiones que pueden extraerse son las siguientes:

4. Las mujeres con ansiedad y las personas sin hogar presentan un importante deterioro de la capacidad antioxidante y de la respuesta inmunitaria, al menos en lo referente a diversas funciones de los fagocitos, los linfocitos y la actividad NK, así como a los niveles de citoquinas. Ambas condiciones se confirman como modelos de envejecimiento prematuro en humanos.

5. La soledad durante la vejez intensifica el deterioro immunoendocrino asociado a la edad, en lo referente a diversas funciones y al contenido en glutatión de los leucocitos, así como a los niveles plasmáticos de corticosterona; y ello a pesar de haber mantenido una vida social normal durante las etapas vitales anteriores.

En lo referente al tercer objetivo, *“Caracterizar los cambios inmunitarios, a nivel de diversas funciones y del contenido en glutatión de linfocitos esplénicos y tímicos, así como la concentración de corticosterona plasmática, en ratones hembras y machos viejos triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer”*, se puede concluir que:

6. El deterioro de algunos marcadores funcionales de inmunosenescencia sistémica es más pronunciado en los animales viejos triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer que en los correspondientes controles no transgénicos, siendo los machos, que además presentan una mayor mortalidad, los más afectados y los que muestran unos niveles aumentados de corticosterona.

Con respecto al objetivo consistente en la *“Caracterización del efecto de la administración de N-acetilcisteína sobre diversas funciones de las células inmunitarias de sangre periférica, así como sobre el contenido en glutatión de esos leucocitos, y los niveles de malondialdehído, en mujeres postmenopáusicas”*, puede indicarse la siguiente conclusión:

7. La administración de NAC (600 mg/día) a mujeres postmenopáusicas se muestra como una estrategia eficaz, incluso en tratamientos cortos (2-4 meses) y a edades avanzadas (mayores de 70 años), para mejorar de manera prolongada el estado funcional de las defensas inmunológicas, disminuir el daño oxidativo a lípidos, y aumentar los niveles de glutatión intraleucocitario. La determinación del glutatión plasmático no es un marcador adecuado para conocer el nivel de este

antioxidante en el organismo, puesto que puede no relacionarse con el que está presente en los leucocitos circulantes.

Por último, en relación al objetivo de *“Caracterizar el efecto de un ambiente enriquecido sobre diversos aspectos de los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino a lo largo del envejecimiento cronológico y patológico en ratones”*, pueden extraerse las conclusiones que siguen:

8. La exposición de ratones de distintas edades a un ambiente enriquecido produce una importante mejora de una gran variedad de parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales; en el comportamiento de los individuos observado en diversas pruebas conductuales, así como en los cambios morfológicos cerebrales. Esta mejoría es más marcada en los individuos de edades más avanzadas. Además, el establecimiento temprano de una vida en un entorno enriquecido y su mantenimiento hasta los últimos momentos, aumenta la esperanza de vida media de los individuos.

9. El deterioro inmunoendocrino, en base a diversos parámetros de función inmunológica y a los niveles de corticosterona, es menor en los animales viejos triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer que han vivido en un ambiente enriquecido, y especialmente en los machos, y esto incluso un tiempo después de haberles sido retirado dicho ambiente enriquecido. No obstante, los animales no transgénicos, y en especial las hembras, se muestran susceptibles a la retirada del enriquecimiento ambiental, presentando un deterioro mayor al mostrado por las hembras control en algunos marcadores del sistema inmunitario y en los niveles de corticosterona.

Como conclusión general, se puede decir que los animales que alcanzan una gran longevidad son los que mantienen una funcionalidad en sus células inmunitarias y un estado redox similares a los de la edad adulta. Además, unos niveles preservados de activación del NF κ B, que posibilitan un adecuado ambiente basal antioxidante y antiinflamatorio, permiten una función inmunitaria más adecuada y son clave para alcanzar la longevidad con buen estado de salud. Sencillas estrategias como mantener una vida social, intelectual y física activa,

controlar los niveles de estrés, o el aporte de precursores de antioxidantes endógenos tienen un fuerte impacto sobre funciones inmunológicas relevantes, y pueden ayudar a envejecer saludablemente y/o contribuir a aumentar la calidad de vida en la vejez y, consecuentemente, la longevidad.

Conclusions

The conclusions drawn from the present doctoral thesis are listed below.

As regards the first objective, *"Immune and neurologic characterization of old and long-lived mice"*, it is concluded that:

1. A great variety of peritoneal lymphocyte and macrophage functional responses as well as oxidative and inflammatory stress markers are preserved in long-lived mice, whereas leucocytes from old subjects show markedly deteriorated functions and high oxidation-inflammation levels. Thus, the immune system status may contribute to slow down or accelerate the ageing process. Controlled activation of the transcription factor NF κ B in resting leucocytes seems to be crucial for maintenance of this adequate redox and anti-inflammatory status that is related to preserved immune functions and to longevity achievement, and to which strengthened catalase activity and IL-10 levels contribute.

2. Entorhinal cortex is the brain region primary affected in old mice, whereas cerebral deterioration in the long-lived initiates in somatosensory cortex.

3. Long-lived animals are highly resistant to oxidation derived molecular damage to lipids and proteins in the nervous and immune systems, whereas old subjects show increased lipid susceptibility to oxidation and higher levels of a variety of protein oxidative damage markers when compared to the adults and long-lived. These protein damage levels and changes in chymotrypsin and caspase-like activities of the 20S proteasome do not seem to be directly related, in terms of ageing and longevity.

In relation to the second great aim of the present thesis, *"Characterization of the effect of neuroendocrine alterations, based on chronic psychological stress, on immune markers of health and longevity"*, it can be concluded that:

4. Anxious women and homeless people show an important decline in the antioxidant capacity as well as in the immune response, at least regarding several

phagocyte and lymphocyte functions, NK activity, and cytokine levels. Both conditions are confirmed as premature ageing models in humans.

5. Social isolation during old age intensifies the age-related immune-endocrine decline, as regards several functions and glutathione content of leucocytes, as well as plasma corticosterone levels; and this in spite of a normal previous social life.

With regard to the third aim, *"Characterization of immune changes, in terms of several functions and glutathione content of splenic and thymic lymphocytes, and plasma corticosterone concentration, in old female and male triple-transgenic mice for Alzheimer's disease"*, it is concluded that:

6. Old triple-transgenic mice for Alzheimer's disease show more pronounced deterioration in some functional markers of systemic immune-senescence than the corresponding non-transgenic controls. Moreover, the higher mortality rate observed in triple-transgenic males relates to greater vulnerability of these immune parameters and to increased corticosterone levels.

As regards the objective *"Characterization of the effect of N-acetylcysteine administration on several peripheral immune cell functions, as well as on the glutathione content in those leucocytes, and the levels of malondialdehyde, in postmenopausal women"*, the following conclusion can be drawn:

7. NAC administration (600 md/day) to postmenopausal women is an efficient strategy, even in short-term treatments (2-4 months) and at advanced age (over 70 years), leading to extended improvement of immune defenses, decreased lipid oxidative damage, and increased glutathione levels in leucocytes. Plasma glutathione is not an adequate marker to know the levels of this antioxidant in the organism, as it can be unrelated to the levels present in circulating leucocytes.

Finally, in regard to the objective *"Characterization of the effect of an enriched environment on several aspects of the immune, nervous and endocrine systems throughout both chronological and pathological ageing in mice"*, it can be concluded that:

8. Exposition to an enriched environment of animals at different ages leads to improvement of a great variety of functional and oxidative stress parameters in peritoneal leucocytes, as well as to behavioural improvements in several tests and decreased morphological decline in brain. Animals at advanced ages show the most marked effects. Moreover, early in life establishment of the enriched environment, and its maintenance until death, increases the average life span of the individuals.

9. Immune-endocrine deterioration, in terms of several immune function parameters and corticosterone levels, is lower in triple-transgenic old mice for Alzheimer's disease which have been exposed to an enriched environment, especially in males, and these effects are observed even after removal of the environmental enrichment. However, non-transgenic animals, and especially females, are susceptible to removal of the enriched environment, as shown by increased deterioration of several immune markers and corticosterone levels with respect to control females.

In conclusion, animals which achieve great longevity are those which preserve adult-like functionality of immune cells and redox state. In addition, preserved NF κ B activation levels make an adequate antioxidant and anti-inflammatory environment possible, and thereby allow a more adequate immune function, playing a key role in achievement of longevity in good health. Easy strategies, such as maintenance of an active social, intellectual and physical life, stress level control, or supplementation with endogenous antioxidant precursors, exert a great influence on relevant immune functions, and might help healthy ageing and/or contribute to increased quality of life in ageing and, consequently, longevity.

Referencias

- Ackerman KD, Felten SY, Bellinger DL, Felten DL. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen III: Development of innervation in rat spleen. *J Neurosci Res* 1987;18:49-54.
- Agarwal S, Sohal RS. Aging and proteolysis of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys* 1994;309:24-28.
- Aggarwal S, Gupta S. Increase apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2 and Bax. *J Immunol* 1998;160:1627-1637.
- Aggarwal S, Gupta S. Increased activity of caspase 3 and caspase 8 in anti-Fas apoptosis in lymphocytes from ageing humans. *Clin Exp Immunol* 1999;117:285-290.
- Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002;71:1-8.
- Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 2007;42:421-426.
- Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 1997;324:565-570.
- Ahmed SA, Talal N, Wallace DJ, Hahn BH. The importance of sex hormones in Lupus. En: *Dubois' Lupus erythematosus* (4^a Ed.). 1993, pp. 148-156. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383-421.
- Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4⁺ T cells in humans. *Mech Ageing Dev* 2006;127:560-566.
- Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 1996;60:563-572.
- Alonso-Fernández P. Estudio del perfil inmunológico en individuos centenarios. Tesis doctoral (UCM) 2006.
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 2008;56:2244-2251.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1203-1210.

- Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006a;22:767-777.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol* 2006b;30:1168-1180.
- Álvarez P. La suplementación en la dieta con compuestos antioxidantes mejora la función y neutraliza el estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratón. Papel en el envejecimiento y en el shock endotóxico. Tesis doctoral (UCM) 2006.
- Álvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jiménez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* 2006;22:913-921.
- Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav* 2008;93:388-394.
- Ambrée O, Leimer U, Herring A, Görtz N, Sachser N, Heneka MT, Paulus W, Keyvani K. Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways. *Am J Pathol* 2006;169:544-552.
- Anderson ME, Luo JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis* 1998;18:415-424.
- Anthony IC, Crawford DH, Bell JE. B lymphocytes in the normal brain: contrasts with HIV-associated lymphoid infiltrates and lymphomas. *Brain* 2003;126:1058-1067.
- Araga S, Kagimoto H, Funamoto K, Takahashi K. Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 1991;84:259-263.
- Arai T, Yamada H, Namba T, Mori H, Ishii H, Yamashita K, Sasada M, Makino K, Fukuda K. Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1185-1193.
- Aranda R, Doménech E, Rus AD, Real JT, Sastre J, Viña J, Pallardó FV. Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* 2007;41:1195-1200.
- Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* 2004;15:1751-1754.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007;62:1-8.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1252-1262.

- Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario asociado a la edad. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009;44:137-142.
- Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med* 2005;7:229-242.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989;6:593-597.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
- Aspinall R. Longevity and the immune response. *Biogerontology* 2000;1:273-278.
- Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 1997;138:3842-3848.
- Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007;120:435-446.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005;164:775-778.
- Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Ohura K. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 is a negative regulator of macrophage functions. *Int Immunopharmacol* 2001;1:2101-2108.
- Azuma C, Tanabe T, Konishi M, Kinashi T, Noma T, Matsuda F, Yaoita Y, Takatsu K, Hammarström L, Smith CI. Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res* 1986;14:9149-9158.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.
- Baeza I, Alvarado C, Ariznavarreta C, Castillo C, Tresguerres JA, De la Fuente M. Effect of growth hormone treatment on lymphocyte functions in old male rats. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:279-284.
- Baeza I, Alvarado C, Alvarez P, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Fdez-Tresguerres JA, De la Fuente M. Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *J Reprod Immunol* 2009;80:70-79.
- Bagasra O, Howedy A, Kajdascy-Balla A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* 1988;65:405-409.
- Baggio G, Donazzan S, Monti D, Mari D, Martini S, Gabelli C, Dalla Vestra M, Previato L, Guido M, Pigozzo S, Cortella I, Crepaldi G, Franceschi C. Lipoprotein (a) and lipoprotein profiles in healthy centenarians: a reappraisal of vascular risk factors. *FASEB J* 1998;12:433-437.
- Bagnara GP, Bonsi L, Strippoli P, Bonifazi F, Tonelli R, D'Addato S, Paganelli R, Scala E, Fagiolo U, Monti D, Cossarizza A, Bonafe M, Franceschi C. Hematopoiesis in healthy old people and

- centenarians: well maintained responsiveness of CD34+ cells to hematopoietic growth factors and remodeling of cytokine network. *J Gerontol* 2000;55:B61-B66.
- Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 2001;56:472-477.
- Banks WA. Cytokine's CVs and the blood-brain barrier. En: *Psychoneuroimmunology*. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 2001, pp. 483-499. Academic Press, New York.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004;27:595-600.
- Barna BP, Estes ML, Jacobs BS, Hudson S, Ransohoff RM. Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor- α . *J Neuroimmunol* 1990;30:239-243.
- Barnes PJ, Karin M Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071.
- Bartik MM, Brooks WH, Roszman TL. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell Immunol* 1993;148:408-421.
- Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 2000;163:495-529.
- Batuman OA, Ferrero A, Cupp C, Jimenez SA, Khalili K. Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human t and glial cells. *J Immunol* 1995;155:4397-4405.
- Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:241-250.
- Bautz F, Rafii S, Kanz L, Möhle R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 2000;28:700-706.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Zastrow MV, Beattie MS, Malenka RC. Control of synaptic strength by glial TNF. *Science* 2002;295:2282-2285.
- Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961;4:561-571.
- Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring anxiety: Psychometric Properties. *J Consult Clin Psychol* 1988;56:893-897.
- Beck AT. Beck Anxiety Inventory. Spanish Version. 1993, Psychological Corporation, San Antonio.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133-140.
- Bellinger DL, Lorton D, Brouxhon S, Felten S, Felten DL. The significance of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in immunomodulation. *Adv Neuroimmunol* 1996;6:5-27.

- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. En: Psychoneuroimmunology. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 2001, pp. 241-286. Academic Press, New York.
- Ben-Yehuda A, Weksler ME. Host resistance and the immune system. Clin Geriatr Med 1992;8:701-711.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. Eur J Neurosci 2004;20:1341-1347.
- Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. Brain Behav Immun 1996;10:77-91.
- Berczi I, Chalmers IM, Nagy E, Warrington RJ. The immune effects of neuropeptides. Baillieres Clin Rheumatol 1996;10:227-257.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997;272:20313-20316.
- von Bernhardt R. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. Neurotox Res 2007;12:215-232.
- Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. Clin Exp Immunol 1977;27:1-12.
- Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. J Immunol 1985;135:750-754.
- Besedovsky H, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocrin Rev 1996;17:64-102.
- Besedovsky H, del Rey A. Cytokines as mediators of central and peripheral immune-neuroendocrine interactions. En: Psychoneuroimmunology. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 2001, pp. 1-17. Academic Press, New York.
- van den Biggelaar AH, Huizinga TW, de Craen AJ, Gussekloo J, Heijmans BT, Frölich M, Westendorp RG. Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. Exp Gerontol 2004;39:1407-1414.
- Billings L, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. Neurone 2005;45:675-688.
- Bischof F, Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. Cell Immunol 1998;187:38-44.
- Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. Mutat Res 2003;531:37-80.
- Blalock JE. The immune system as a sensory organ. J Immunol 1984;132:1067-1070.
- Blalock JE, Harbour-McMenamin D, Smith EM. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. J Immunol 1985;135:858-861.

- Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989;69:1-32.
- Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994;15:504-511.
- Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interactions: role of memory D cells and CD5+B cells. *J Immunol* 2001;167:6132-6139.
- Blatteis CM. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* 1992;91:409-412.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
- Boehmer ED, Meehan MJ, Cutro BT, Kovacs EJ. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mech Ageing Dev* 2005;126:1305-1313.
- Bonafè M, Valensin S, Gianni W, Marigliano V, Franceschi C. The unexpected contribution of immunosenescence to the leveling off of cancer incidence and mortality in the oldest old. *Crit Rev Oncol./Hematol* 2001;39:227-233.
- Bonafè M, Barbi C, Storci G, Salvioli S, Capri M, Olivieri F, Valensin S, Monti D, Gonos ES, De Benedictis G, Franceschi C. What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Exp Gerontol* 2002;37:1263-1271.
- Bonahomi L, Gazzaniga A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *Eur J Respir Dis* 1980;61:45-51.
- Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol* 2008;193:183-187.
- Bor DH, Epstein PR. Pathogenesis of respiratory infection in the disadvantaged. *Semin Respir Infect* 1991;6:194-203.
- Borella P, Bargellini A, Rovesti S, Pinelli M, Vivoli R, Solfrini V, Vivoli G. Emotional stability, anxiety, and natural killer activity under examination stress. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:613-627.
- Borgström L, Kagedal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1986;31:217-222.
- Borkan GA, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 1980;35:177-184.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 2003;5:546-552.

- Borrás C, Gambini J, Viña J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci* 2007;12:1008-1013.
- Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Peña J, Solana R. NK phenotypic markers and IL-2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 1999;34:253-265.
- Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 2007;564:146-149.
- Boucher N, Dufeu-Duchesne T, Vicaut E, Farge D, Effros RB, Schachter F. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol* 1998;33:267-282.
- Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun* 2008;22:105-113.
- Boxer LA. Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. En: *Hematology Fifth ed.* Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, Eds. 1995, McGraw-Hill, New York.
- Boyden SV. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962;115:453-456.
- Breder C, Dinarello C, Saper C. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 1988;240:321-324.
- Breithaupt T, Eylar EH, Báez I, Vázquez A, Colón-Martínez S, Rodríguez J, Kessler M. N-acetylcysteine (NAC) reverses the supposed mitogenic responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from aged rhesus monkeys. *FASEB J* 1996;10:1849.
- Breitkreutz R, Pittak N, Nebe CT, Schuster D, Brust J, Beichert M, Hack V, Daniel V, Edler L, Dröge W. Improvement of immune functions in HIV infection by sulphur supplementation – two randomized trials. *J Mol Med* 2000;78:55-62.
- Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994;44:227-232.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003;17:2042-2046.
- Brown R, Li Z, Vriend CY, Nirula R, Janz L, Falk J, Nance DM, Dyck DG, Greenberg AH. Suppression of splenic macrophage interleukin-1 secretion following intracerebroventricular injection of interleukin-1 β : evidence for pituitary-adrenal and sympathetic control. *Cell Immunol* 1991;132:84-93.
- Brüünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003;23:15-39.

- Bulloch K, Cullen MR, Schwartz RH, Longo DL. Development of innervation within syngeneic thymus tissue transplanted under the kidney capsule of the nude mouse: a light and ultrastructural microscope study. *J Neurosci Res* 1987;18:16-27.
- Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 2001;276:30057-30063.
- Bumiller A, Gotz F, Rohde W, Dorner G. Effects of repeated injections of interleukin 1 β or lipopolysaccharide on the HPA axis in the newborn rat. *Cytokine* 1999;11:225-230.
- Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981;213:222-224.
- Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 1992;131:1261-1269.
- Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*. 1995;373:531-536.
- Burnet FM. An immunological approach to ageing. *Lancet* 1970;2:358-360.
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol* 2001;70:881-886.
- Caamaño JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventós-Suárez C, Snapper CM, Bravo R. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* 1998;187:185-196.
- Cai NS, Li DD, Cheung HT, Richardson A. The expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated mouse lymphocytes declines with age. *Cell Immunol* 1990;130:311-319.
- Cakman I, Rowher J, Schutz RM, Kirchner H, Rink L. Dysregulation between Th1 and Th2 T cell sub-populations in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1996;87:197-209.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res* 2001;26:739-764.
- Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995;9:401-412.

- Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines and chemokines--their receptors and their genes: an overview. *Adv Exp Med Biol* 2003;520:8-32.
- Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, Sanderson CJ, Young IG. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6629-6633.
- Candore G, Di Lorenzo G, Melluso M, Cigna D, Colucci AT, Modica MA, Caruso C. γ -IFN, IL-4 and IL-6 in vitro production in old subjects. *Autoimmunity* 1993;16:275-280.
- Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, Pamplona R, Barja G. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology*. 2008;9:183-196.
- Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1461-1474.
- Carrasco M, Hernanz A, De la Fuente M. Effect of cholecystokinin and gastrin on human peripheral blood lymphocyte functions, implication of cyclic AMP and interleukin-2. *Regul Peptides* 1997;70:135-142.
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Qualitative versus quantitative caloric intake: are they equivalent paths to successful aging? *Neurobiol Aging* 2002;23:747-769.
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee H-G, Smith MA, Joseph JA. Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci* 2004;7:309-316.
- Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000;31:578-585.
- Cederholm T, Persson M, Andersson P, Stenvinkel P, Nordfors L, Madden J, Vedin I, Wretling B, Grimble RF, Palmblad J. Polymorphisms in cytokine genes influence long-term survival differently in elderly male and female patients. *J Intern Med* 2007;262:215-223.
- Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Armstrong C, Wang H, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilaateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain* 2001;94:231-244.
- Chau S, Chin M, Chang J, Luecha A, Cheng E, Schlesinger J, Rao V, Huang D, Maxwell AE, Usatine R, Bastani R, Gelberg L. Cancer risk behaviors and screening rates among homeless adults in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:431-438.
- Chen J, Flurkey K, Harrison DE. A reduce peripheral blood CD4+ lymphocyte proportion is a consistent ageing phenotype. *Mech Ageing Dev* 2002;123:145-153.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 1994;12:139-153.
- Chesnokova V, Melmed S. Minireview: neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002;143:1571-1574.

- Chirico S, Smith C, Marchant C, Mithison MJ, Halliwell B. Lipid peroxidation in hyperlipemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic Res* 1993;19:51-57.
- Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol* 2000;35:721-728.
- Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid. Redox. Signal* 2006;8:572-581.
- Cirrito JR, Holtzman DM. Amyloid β and Alzheimer's disease therapeutics: the devil may be in the details. *J Clin Invest* 2003;112:321-323.
- Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007;28:76-82.
- Coffey CE, Lucke JF, Saxton JA, Ratcliff G, Unitas LJ, Billig B, Bryan RN. Sex differences in brain aging: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol* 1998;55:169-179. Erratum en: *Arch Neurol* 1998;55:627.
- Cohen F, Kearney KA, Zegans LS, Kemeny ME, Neuhaus JM, Stites DP. Differential immune system changes with acute and persistent stress for optimists vs pessimists. *Brain Behav Immun.* 1999;13:155-174.
- Cohen Tervaert JW. Translational Mini-Review Series on Immunology of Vascular Disease: Accelerated atherosclerosis in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 2009; En prensa.
- Collins T. Biology of disease: endothelial nuclear factor-KB and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993;68:499-508.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002;37:205-211.
- Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, Motta M, Malaguarnera M, Caruso C. B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 2003;124:389-393.
- Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Vitello S, Lio D, Candore G, Caruso C. B cell immunosenescence in the elderly and in centenarians. *Rejuvenation Res* 2008;11:433-439.
- Comeche M^ªI, Díaz M^ªI, Vallejo MA. Cuestionarios, Inventarios y Escalas, Ansiedad, Depresión y Habilidades Sociales. 1995. Fundación Universidad-Empresa, Madrid.
- Conconi M, Szweda LI, Levine RL, Stadtman ER, Friguet B. Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys* 1996 Jul;331:232-240.
- Conconi M, Friguet B. Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Rep* 1997;24:45-50.

- Correa R, Blanco B, Del Río M, Víctor V, Guayerbas N, Medina S, De la Fuente M. Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 1999;10:195-200.
- Corsini E, Battaini F, Lucchi L, Marinovich M, Racchi M, Govoni S, Galli C. A defective protein kinase C anchoring system underlying age-associated impairment in TNF- α production in rat macrophages. *J Immunol* 1999;163:3468-3473.
- Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997;38:205-227.
- Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:1-9.
- Cryan JF, Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 2004;9:326-357.
- Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *J Appl Physiol* 2008;105:1333-1341.
- Cutler RG. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuvenation Res* 2005;8:138-140.
- Cutolo M, Villaggio B, Candido F, Valensi S, Giusti M, Felli L, Sulli A, Accardo S. Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Ann NY Acad Sci* 1999;876:246-254.
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science* 1993;259:1739-1742.
- van Dam AM, Brouns M, Louisse S, Berkenbosch F. Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness?. *Brain Res* 1992;588:291-296.
- Dantzer R, Bluthé RM, Gheusi G, Cremona S, Laye S, Parnet P, Kelley KW. Molecular basis of sickness behavior. *Ann NY Acad Sci* 1998;856:132-138.
- Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001;83:301-310.
- Davis SL. Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:283-289.
- Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulphated derivative. *J Immunol* 1993;150:5219-5230.
- De Cabo C, Pujol A, Viveros MP. Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50: 277-286.
- De Flora S, Izzoti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med* 1991;91:122-130.

- De Flora S, Cesarone CF, Balansky RM. Chemoprotective properties and mechanism of N-acetylcysteine. The experimental background. *J Cell Biol* 1995;22:33-41.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990;27:457-464.
- De Martinis M, Modesti M, Loreto MF, Quagliano D, Ginaldi L. Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly. *Life Science* 2000;68:139-151.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* 2005;579:2035-2039.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006;80:219-227.
- De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* 1985;81A:935-938.
- De la Fuente M, Del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991;73:205-211.
- De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A. Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J Endocrinol* 1997;153:475-483.
- De la Fuente M, Medina S, Del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sci* 2000;67:2125-2135.
- De la Fuente M, Víctor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000;78:49-54.
- De la Fuente M, Del Río M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001;116:156-167.
- De la Fuente M, Víctor VM. Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocyte from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res* 2001;35:73-84.
- De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:55-58.
- De la Fuente M. Inmunosenescencia. En: *Bioquímica y fisiopatología del envejecimiento*. Cascales M, Cabezas JA, García-Barreno P, Eds. 2003. Instituto de España, Madrid.
- De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas S, Fernández B, Viveros P. Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely aging mice. *Neurochem Int* 2003;1305:1-8.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Álvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004a;50:683-690.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Tresguerres JA. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 2004b;5:389-400.

- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal* 2005;7:1356-1366.
- De la Fuente M, Medina S. NPY and phagocytic cell functions. En: *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. Zukowska Z, Feuerstein GZ, Eds. 2005, pp. 107-122. Birkhaäuser Verlag Basel, Switzerland.
- De la Fuente M. El sistema inmunitario en el envejecimiento. En: *Bioquímica y fisiopatología del sistema inmune*. Cascales M, García-Barreno P, Eds. 2007, pp. 193-243. Instituto de España, Madrid.
- De la Fuente M. Role of the immune system in aging. *Inmunología* 2008a;27:176-191.
- De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008b;15:213-223.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Víctor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008;42:272-280.
- De la Fuente M, Giménez-Llort L. Models of aging of neuroimmunomodulation. Strategies for its improvement. *Neuroimmunomodulation* 2009; En prensa.
- De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009;15:3003-3026.
- De la Rosa O, Tarazona R, Casado JG, Alonso C, Ostos B, Peña J, Solana R. Va24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol* 2002;37:213-217.
- De la Rosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* 2006;7:471-481.
- Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 1994;15:15-22.
- Del Río M, Ruedas G, Medina S, Víctor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 1998;63:871-881.
- Dhakshinamoorthy S, Long DJ2nd, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* 2000;36:201-216.
- Dhenain M, Michot JL, Volk A, Picq JL, Boller F. T2-weighted MRI studies of mouse lemurs: a primate model of brain aging. *Neurobiol Aging* 1997;18:517-521.
- Dhenain M, Michot JL, Privat N, Picq JL, Boller F, Duyckaerts C, Volk A. MRI description of cerebral atrophy in mouse lemur primates. *Neurobiol Aging* 2000;21:81-88.
- Di Bona D, Vasto S, Capurso C, Christiansen L, Deiana L, Franceschi C, Hurme M, Mocchegiani E, Rea M, Lio D, Candore G, Caruso C. Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 2009;8:36-42.

- Diana A, van Dam AM, Winblad B, Schultzberg M. Co-localization of interleukin-1 receptor type 1 and interleukin-1 receptor antagonist with vasopressin in magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei of rat hypothalamus. *Neuroscience* 1999;89:137-147.
- Diamond MC. Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain. 1988. The Free Press, New York.
- Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood*. 2002;99:2532-2540.
- Dikov MM, Oyama T, Cheng P, Takahashi T, Takahashi K, Sepetavec T, Edwards B, Adachi Y, Nadaf S, Daniel T, Gabrilovich DI, Carbone DP. Vascular endothelial growth factor effects on nuclear factor-kappaB activation in hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res* 2001;61:2015-2021.
- Dinareello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:253-265.
- Donnini A, Argentati K, Mancini R, Smorlesi A, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Phenotype, antigen-presenting capacity, and migration of antigen-presenting cells in young and old age. *Exp Gerontol* 2002;37:1097-1112.
- Dorssers L, Burger H, Bot F, Delwel R, Geurts van Kessel AH, Löwenberg B, Wagemaker G. Characterization of a human multilineage-colony-stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse interleukin-3. *Gene* 1987;55:115-124.
- Draper HH, Csallany AS, Hadley M. Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1071-1077.
- Dringenberg HC. Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' – evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 2000;115:235-249.
- Dröge W, Eck HP, Näher H, Pekar U, Daniel V. Abnormal amino acid concentrations in the blood of patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) may contribute to the immunological defect. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1988;369:143-148.
- Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H. Function of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994;8:1131-1138.
- Dröge W, Breitekreutz R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* 2000;59:595-600.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002a;82:47-95.
- Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002b;37:1333-1345.
- Dröge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 2002c;1:257-268.
- Dröge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B* 2005;360:2355-2372.

- Edström E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramírez-León V, Ulfhake B. Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol Behav* 2007;92:129-135.
- Effros RB, Pawelec G. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick limit lead to immune exhaustion?. *Immunol Today* 1997;18:450-454.
- Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2006;113:1685-1695.
- Eisenberger NI, Lieberman MD, Williams KD. Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion. *Science* 2003;302:290-292.
- Elenkov I, Kovacs K, Duda E, Stark E, Vizi E. Presynaptic inhibitory effect of TNF-alpha on the release of noradrenaline in the median eminence. *J Neuroimmunol* 1992;41:117-120.
- Elenkov I, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:374-381.
- Elenkov I, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52:595-638.
- Enns LC, Wiley JC, Ladiges WC. Clinical relevance of transgenic mouse models for aging research. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008;18:81-91.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 1994;14:897-913.
- Eriksson M, Meadows SK, Basu S, Mselle TF, Wira CR, Sentman CL. TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. *J Immunol* 2006;176:6219-6224.
- Esparza B, Sanchez H, Ruiz M, Barranquero M, Sabino E, Merino F. Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol Invest* 1996;25:185-190.
- Esterling BA, Antoni MH, Kumar M, Segneiderman N. Defensiveness, trait-anxiety, and Epstein-Barr viral capsid antigen antibody titers in healthy college students. *Health Psychol* 1993;12:132-139.
- Everitt AV, Burgess JA. Hypothalamus pituitary and aging. 1976. Charles C Thomas, Springfield IL.
- Eylar E, Rivera-Quinones C, Molina C, Báez I, Molina F, Mercado CM. N-acetylcysteine enhances T cell functions and T cell growth in culture. *Int Immunol* 1993;5:97-101.
- Fabris N. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr* 1991;12:219-230.
- Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993;23:2375-2378.

- Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of cytotoxic CD8+CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* 1996;88:501-507.
- Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, Casti A, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Shortage of circulating naive CD8+ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood* 2000;95:2860-2868.
- Farr SA, Poon HF, Drogukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem* 2003;84:1173-1183.
- Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004;18:203-205.
- Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowska JA, Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987;100:225-260.
- Felten SY, Felten DL. Innervation of lymphoid tissue. En: *Psychoneuroimmunology*. 2nd ed. Ader R, Felten DL, Cohen R, Eds. 1991, pp. 27-38. Academic Press, San Diego, CA.
- Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J Chromatogr A* 2001;921:237-245.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol* 1995;50:378-382.
- Fernández CI, Collazo J, Bauza Y, Castellanos MR, López O. Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: issues for a therapeutic approach in human aging. *Ann NY Acad Sci* 2004;1019:53-57.
- Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:233-245.
- Ferrández MD, De la Fuente M. Changes with ageing, sex and physical exercise in murine natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mech Ageing Dev* 1996;86:83-94.
- Ferrández MD, Correa R, Del Río M, De la Fuente M. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675-685.
- File SE, Mabbutt PS, Walker JH. Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments: Modulatory factors. En: *Neural Mechanisms and Biological Significance of Grooming Behaviour*. Colbern DC, Gispén WH, Eds. *Ann NY Acad Sci* 1988;525:69-79.

- File SE. Behavioral detection of anxiolytic action. En: Experimental approaches to anxiety and depression. Elliot JM, Heal J, Marsden CA, Eds. 1992, pp. 25-44. Wiley, New York.
- Fiserová A, Starec M, Kuldová M, Kováru H, Páv M, Vannucci L, Pospíšil M. Effects of D2-dopamine and α -adrenoceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness of mice. *J Neuroimmunol* 2002;130:55-65.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
- Fontan G, Llorente F, García Rodríguez MC, Ojeda JA. Defective neutrophil chemotaxis and hyperimmunoglobulinemia E. *Acta Pediatr Scand* 1976;65:509-513.
- Forsmark-Andrée P, Dallner G, Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1995;19:749-757.
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4765-4779.
- Foster TC, Fugger HN, Cunningham SG. Receptor blockade reveals a correspondence between hippocampal-dependent behavior and experience-dependent synaptic enhancement. *Brain Res* 2000;871:39-43.
- Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 2006;175:1-8.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 1995;16:12-16.
- Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafè M. Biomarkers of immunosenescence within a evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* 1999;34:911-921.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000a;18:1717-1720.
- Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. The network and the remodelling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 2000b;35:879-896.
- Franceschi C, Valensin S, Lescai F, Olivieri F, Licastro F, Grimaldi LM, Monti D, De Benedictis G, Bonafè M. Neuroinflammation and the genetics of Alzheimer's disease: the search for a proinflammatory phenotype. *Aging Clin Exp Res* 2001;13:163-170.
- Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* 2007;65:S173-S176.

- Frasca D, Nguyen D, Riley RL, Blomberg BB. Effects of aging on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev* 2003;124:361-369.
- Friedman EM, Irwin MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 1997;74:27-38.
- Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:143-154.
- Frolkis VV. Aging and life prolonging processes. 1982. Springer Verlag, Wien, New York.
- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N^{epsilon}-(Carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996;271:9982-9986.
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 2004;3:217-226.
- Fushimi T, Shimura S, Suzuki S, Saitoh H, Okayama H, Shirato K. Suppression of gene expression and production of interleukin 13 by dexamethasone in human peripheral blood mononuclear cells. *Tohoku J Exp Med* 1998;185:157-160.
- Gabellec M, Griffais R, Fillion G, Haour F. Interleukin-1 receptors type I and type II in the mouse brain: kinetics of mRNA expressions after peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 1996;66:65-70.
- Gabellec M, Crumeyrolle-Arias M, Le Saux F, Auriou N, Jacque C, Haour F. Expression of interleukin-1 genes and interleukin-1 receptors in the mouse brain after hippocampal injury. *Neurosci Res* 1999;33:251-260.
- Gabriel P, Cakman I, Rink L. Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp Gerontol* 2002;37:235-247.
- Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998;92:4150-4166.
- Gaillard RC. Neuroendocrine-immune systems interaction. The immune hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 1994;5:303-309.
- Gandy J, Bates HK, Conder LA, Harbison RD. Effects of reproductive tract glutathione enhancement and depletion on ethyl methanesulfonate-induced dominant lethal mutations in Sprague-Dawley rats. *Teratog Carcinog Mutagen* 1992;12:61-70.
- Gardner EM, Murasko DM. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology* 2002;3:271-289.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495-521.

- Gavish D, Breslow JL. Lipoprotein reduction by N-acetylcysteine. *Lancet* 1991;337:203-204.
- Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol* 2007;85:471-475.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Rosa R, Vivo M, Oddo S, Navarro X, LaFerla FM, Johansson B, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's dementia in 3xTg-AD mice. En: *Alzheimer's Disease: New Advances*. Iqbal K, Winblad B, Ávila J, Eds. 2006, pp. 513-516. Medimond S.r.l., Bologna.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:125-147.
- Giménez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:331-343.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999a;20:117-126.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Martorelli V, Quaglino D. The immune system in the elderly II. Specific cellular immunity. *Immunol Res* 1999b;20:109-115.
- Ginaldi L, De Martinis M, Modesti M, Loreto MF, Corsi MP, Quaglino D. Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology* 2000;46:242-248.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Modesti M, Quaglino D. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 2001;67:63-72.
- Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25:346-361.
- Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F. β -amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 2002;11:257-274.
- Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 2000;21:515-521.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1493-1505.
- Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF, Watkins LR. Interleukin-1 beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and the nervous systems. *J Neurosci* 1999;19:2799-2806.
- Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martínez C, Rosignoli F, García-Gómez M, Leceta J, Juarranz Y. Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J Leukoc Biol* 2005;78:491-502.

- Gomariz RP, Arranz A, Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, Garcia-Gomez M, Leceta J, Martínez C. Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity. *Peptides* 2007;28:1825-1832.
- Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 2008;43:718-728.
- Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T. Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired blood monocytes in the elderly. *Clin Exp Immunol* 1996;106:120-126.
- Goodman L, Saxe L, Harvey M. Homelessness as psychological trauma. Broadening perspectives. *Am Psychol* 1991;46:1219-1225.
- Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Fournau C. Thiol regulation of the production of TNF- α , IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999;14:98-105.
- Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK. Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:251-259.
- Goya RG. The immune-neuroendocrine homeostatic network and aging. *Gerontology* 1991;37:208-213.
- Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus W, Sachser N. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res* 2008;191:43-48.
- Grammas P, Ovase R. Cerebrovascular transforming growth factor- β contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 2002;160:1583-1587.
- Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001a;15:1589-1591.
- Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* 2001b;33:279-287.
- Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005;140:540-546.
- Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994;16:9-13.
- Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1 α gene polymorphism. *Ann Neurol* 2000;47:361-365.

- Grimble RF. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* 1998;14:634-640.
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997;11:526-534.
- Grune T, Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* 2003;24:195-204.
- Gruss HJ, Dower SK. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther* 1995;1:75-105.
- Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007;211:144-156.
- Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002a;37:249-256.
- Guayerbas N, Catalán M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002b;134:41-48.
- Guayerbas N, De la Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339-350.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, de la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in prematurely ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004;50:OL677-681.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice. *J Appl Biomed* 2005a;3:199-205.
- Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, De la Fuente M. Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioural dysfunction in prematurely ageing mice. *Pharmacol. Biochem Behav* 2005b;80:45-51.
- Guerreiro RJ, Santana I, Brás JM, Santiago B, Paiva A, Oliveira C. Peripheral inflammatory cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis* 2007;4:406-412.
- Gust DA, Wilson ME, Stocker T, Conrad S, Plotsky PM, Gordon TP. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metabol* 2000;85:2556-2563.
- Hamelin M, Mary J, Vostry M, Friguet B, Bakala H. Glycation damage targets glutamate dehydrogenase in the rat liver mitochondrial matrix during aging. *FEBS J* 2007;274:5949-5961.
- Han D, Hosokawa T, Aoike A, Kawai K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mech Ageing Dev* 1995;84:39-54.
- Harakech S, Jariwalla RJ. Comparative study of the anti-HIV activities of ascorbate and thiol-containing reducing agents in chronically HIV infected cells. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1231-1235.
- Harbuz M. Neuroendocrine-immune interactions. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:51-52.

- Hargreaves EL, Boon F, Cain DP. Rats housed in a complex environment exhibit greater hilar LTP than individually housed littermates. *Soc Neurosci Abstr* 1992;18:344.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature* 1990;345:458-460.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972;20:145-147.
- Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging* 1997;18:285-289.
- Hatzinger M, Z'Brun A, Hemmeter U, Seifritz E, Baumann F, Holsboer-Trachsler E, Heuser IJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal system function in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1995;16:205-209.
- Hauer K, Hildebrandt W, Sehl Y, Edler L, Oster P, Dröge W. Improvement in muscular performance and decrease in tumor necrosis factor level in old age after antioxidant treatment. *J Mol Med* 2003;81:118-125.
- Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 1999;16:581-622.
- Hayflick L. Recent advances in the cell biology of aging. *Mech. Ageing Dev* 1980;14:59-79.
- Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann NY Acad Sci* 2007;1100:1-13.
- He YW, Malek TR. The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis. *Crit Rev Immunol* 1998;18:503-24.
- Hecht SS, Upadhyaya P, Wang M, Bliss RL, McIntee EJ, Kenney PM. Inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice by N-acetyl-S-(N-2-phenethylthiocarbamoyl)-L-cysteine and myo-inositol, individually and in combination. *Carcinogenesis* 2002;23:1455-1461.
- Hedley DW, Currie GA. Monocytes and macrophages in malignant melanoma. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes. *Br J Cancer* 1978;37:747-752.
- Helenius M, Hanninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:487-498.
- Herbert TB, Cohen S. Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull* 1993;113:472-486.
- Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy Appl Immun* 1990;91:166-170.
- Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-

- 1 β , interleukin-6 and tumour necrosis factor- α production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol* 1996;71:25-30.
- Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* 2000;67:1317-1324.
- Herrero A, Portero-Otín M, Bellmunt MJ, Pamplona R, Barja G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 2001;122:427-443.
- Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Villedor AF, Lloberas J, Celada A. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol* 2002;37:389-394.
- Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, Deresinski SC, Herzenberg LA. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1967-1972.
- Hetland ML, Eldrup E, Bratholm P, Christensen NJ. The relationship between age and venous plasma concentrations of noradrenaline, catecholamine metabolites, DOPA and neuropeptide Y-like immunoreactivity in normal human subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1991;51:219-224.
- Hiemke C, Brunner R, Hammes E, Müller H, Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW. Circadian variations in antigen-specific proliferation of human T lymphocytes and correlation to cortisol production. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:335-342.
- High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004;3:1-14.
- Hirokawa J, Sakaue S, Furuya Y, Ishii J, Hasegawa A, Tagami S, Kawakami Y, Sakai M, Nishi S, Nishihira J. Tumour necrosis factor- α regulates the gene expression of macrophage migration inhibitory factor through tyrosinekinase-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem* 1998;123:733-739.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J immunol* 2000;165:618-622.
- Ho E, Chen G, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF- κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J* 1999;13:1845-1854.
- Hobbs MV, Ernst DN. T cell differentiation and cytokine expression in late life. *Dev Comp Immunol* 1997;21:461-170.
- Hoffman GS. Immunosuppressive therapy for autoimmune diseases. *Ann Allergy* 1993;70:263-274.
- Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1 β induction of inflammation, apoptosis and vasogenic edema. *J Neurosurg* 2000;92:108-120.
- Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGF- β in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur J Immunol* 2008;38:912-915.

- Houzen H, Kikuchi S, Kanno M, Shinpo K, Tashiro K. Tumor necrosis factor enhancement of transient outward potassium currents in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 1997;50:990-999.
- Huerta JM, González S, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C. Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: a five-year longitudinal study. *Free Radic. Res.* 2006;40:571-578.
- Hulbert AJ, Faulks SC, Buffenstein R. Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:1009-1018.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007;87:1175-1213.
- Huppert FA, Solomou W, O'Connor S, Morgan K, Sussams P, Brayne C. Aging and lymphocyte subpopulation: whole-blood analysis of immune markers in a large population sample of healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 1998;33:593-600.
- Hüll M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1996;246:124-128.
- Ignatowski T, Noble B, Wright J, Gorfien J, Heffner R, Spengler R. Neuronal-associated TNF- α : its role in noradrenergic functioning and modification of its expression following antidepressant drug administration. *J Neuroimmunol* 1997;79:84-90.
- Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, Willoughby R. Partial sleep deprivation reduced natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med* 1994;56:493-498.
- Iwamura C, Nakayama T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8:7-13.
- Izgüt-Uysal VN, Agac A, Karadogan I, Derin N. Effects of L-carnitine on neutrophil functions in aged rats. *Mech Ageing Dev* 2003;124:341-347.
- Izgüt-Uysal VN, Tan R, Bülbül M, Derin N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol Int* 2004;28:517-521.
- Jackson LA, Spach DH. Emergence of *Bartonella quintana* infection among homeless persons. *Emer Infect Dis* 1996;2:141-144.
- Janeway CA, Travers P, Walport P, Schlomchik M. Cytokines and their receptors. En: *Immunobiology*. 5th ed. Appendix III. Austin P, Lawrence E, Eds. 2001a. Garland Publishing, New York.
- Janeway CA, Travers P, Walport P, Schlomchik M. An introduction to immunobiology and innate immunity. En: *Immunobiology*. 5th ed. Part I, Induced innate responses to infection. Austin P, Lawrence E, Eds. 2001b. Garland Publishing, New York.
- Jankowsky J, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001;63:125-149.

- Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2001;73:873-886.
- Je JH, Lee JY, Jung KJ, Sung B, Go EK, Yu BP, Chung HY. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett* 2004;566:183-189.
- Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Baixeras E. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signalling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2002;188:1-7.
- Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlström U, Rosén A. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;6:883-890.
- Johnson HM, Torres BA, Smith EM, Dion BA, Blalock JE. Regulation of lymphocyte IFN γ production by corticotropin. *J Immunol* 1984;132:246-250.
- Johnson HM, Downs MO, Pontzer CH. Neuroendocrine peptide hormone regulation in immunity. En: *Neuroimmunoendocrinology*. Clin Immunol. Blalock JE, Ed. 1992, pp. 49-83. Karger, Basel.
- Jones DP, Mody VCJr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg PJr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1290-1300.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior R, Cao G, Martin A, Taglialatela G, Bickford PC. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci* 1998;18:8047-8055.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999;19:8114-8121.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 2005a;81:313S-316S.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G, Fisher D. Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem Res* 2005b;30:927-935.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-987.
- Kapphahn RJ, Giwa BM, Berg KM, Roehrich H, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Retinal proteins modified by 4-hydroxynonenal: identification of molecular targets. *Exp Eye Res* 2006;83:165-175.

- Kaschka WP. Psychoneuroimmunology and neuroendocrinology-an integrative view. En: *Current update in Psychoneuroimmunology. Key topics in brain research.* 1997, pp. 1-12. Springer Wien, New York.
- Kassner SS, Bonaterra GA, Kaiser E, Hildebrandt W, Metz J, Schröder J, Kinscherf R. Novel systemic markers for patients with Alzheimer disease? - a pilot study. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:358-366.
- Kaushansky K, O'Hara PJ, Berkner K, Segal GM, Hagen FS, Adamson JW. Genomic cloning, characterization, and multilineage growth-promoting activity of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3101-3105.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 2000;113:61-70.
- Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 2001;50:41-55.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386:493-495.
- Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GW, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med* 1984a;46:7-14.
- Kiecolt-Glaser JK, Ricker D, George J, Messick G, Speicher CE, Garner W, Glaser R. Urinary cortisol levels, cellular immunocompetency, and loneliness in psychiatric inpatients. *Psychosom Med* 1984b;46:15-23.
- Kim H, Swo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF- κ B activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:674-683.
- Kim H, Eliuk S, Deshane J, Meleth S, Sanderson T, Pinner A, Robinson G, Wilson L, Kirk M, Barnes S. 2D gel proteomics: an approach to study age-related differences in protein abundance or isoform complexity in biological samples. *Methods Mol Biol* 2007;371:349-391.
- Kinashi T, Harada N, Severinson E, Tanabe T, Sideras P, Konishi M, Azuma C, Tominaga A, Bergstedt-Lindqvist S, Takahashi M, Matsuda F, Yaoita Y, Takatsu K, Honjo T. Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature* 1986;324:70-73.
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA. The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiol Behav* 2008;93:628-636.
- Kirkwood TBL, Holliday R. The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc London* 1979;205:531-546.
- Kirman I, Zhao K, Tschepen I, Szabo P, Richter G, Nguyen H, Weksler ME. Treatment of old mice with IL-2 corrects dysregulated IL-2 and IL-4 production. *Int Immunol* 1996;8:1009-1015.

- Kitano H, Oda K. Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Mol Syst Biol* 2006;2:2006.0022.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005;25:8843-8853.
- Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav* 1994;56:291-297.
- Kluger MJ, Kozad W, Leon LR, Soszynski D, Conn CA. Fever and antipyresis. *Prog Brain Res* 1998;115:465-475.
- Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* 1991;40:190-196.
- Knight JA. Review: Free Radicals, Antioxidants, and Immune System. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:145-158.
- Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol* 2006;26:307-316.
- Koenig JI. Presence of cytokines in the hypothalamic-pituitary axis. *Prog Neuroendocrinol Immunol* 1991;4:143-153.
- Koh KB, Lee BK. Reduced lymphocyte proliferation and interleukin-2 production in anxiety disorders. *Psychosom Med* 1996;58:80.
- Koike E, Kobayashi T, Mochitate K, Murakami M. Effect of aging on nitric oxide production by alveolar macrophages. *Exp Gerontol* 1999;34:889-894.
- Konsman JP, Kelley K, Dantzer R. Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1 beta, and inducible NOS in rat brain. *Neurosci* 1999;89:535-548.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245-248.
- Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med* 1998;188:1895-1906.
- Krishnaraj R. Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP. *Cell Immunol* 1992;144:11-21.
- Krishnaraj R, Svanborg A. Preferential accumulation of mature NK cells during human immunosenescence. *J Cell Biochem* 1992;50:386-391.
- Krishnaraj R, Bloom T. Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. IL-2 induced interferon γ secretion. *Immunol Lett* 1996;50:59-63.
- Krishnaraj R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Dev* 1997;96:89-101.

- Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann NY Acad Sci* 1998;856:148-159.
- Kruger TE. Immunomodulation of peripheral lymphocytes by hormones of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Adv Neuroimmunol* 1996;6:387-395.
- Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72:595-607.
- Kumar R, Burns EA. Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines* 2008;7:467-479.
- Kutza I, Murasko DM. Effects of aging on natural killer activity and activation by interleukin-2 and IFN- γ . *Cell Immunol* 1994;155:195-204.
- Lacelle C, Xu S, Wang E. Identification of high caspase-3 mRNA expression as a unique signature profile for extremely old individuals. *Mech Ageing Dev* 2002;123:1133-1144.
- Lai F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol* 1989;46:849-853.
- Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Merry BJ. Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech Ageing Dev* 2004;125:529-538.
- Landfield PW, Blalock EM, Chen KC, Porter NM. A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007;4:205-212.
- Laviola G, Hannan AJ, Macrì S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* 2008;31:159-168.
- Lawrence RA, Burck RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-958.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 2005;120:701-713.
- Le Maoult J, Szabo P, Weksler ME. Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development. *Immunol Rev* 1997;160:115-126.
- Lechin F, Van der Dijs B, Benaim M. Stress versus depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996;20:899-950.
- Ledochowski M, Murr C, Jager M, Fuchs D. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp Gerontol* 2001;36:1739-1747.
- Lee F, Yokota T, Otsuka T, Gemmell L, Larson N, Luh J, Arai K, Rennick D. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4360-4364.
- Lekander M, Axén J, Knutsson U, Olgart Hoglund C, Werner S, Wikstrom AC, Stierna P. Cytokine inhibition after glucocorticoid exposure in healthy men with low versus high basal cortisol levels. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:245-250.

- Lemere CA, Spooner ET, LaFrancois J, Malester B, Mori C, Leverone JF, Matsuoka Y, Taylor JW, DeMattos RB, Holtzman DM, Clements JD, Selkoe DJ, Duff KE. Evidence for peripheral clearance of cerebral Abeta protein following chronic, active Abeta immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis* 2003;14:10-18.
- Lenton KJ, Therriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1194-1200.
- Leonard BE, Song C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:299-303.
- Lernbecher T, Müller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365:767-770.
- Levy SM, Herberman RB, Lee J, Whiteside T, Beadle M, Heiden L, Simons A. Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1991;10:289-307.
- Lewis T. The blood vessels of the human skin and their responses. 1927. Shaw & Sons, London.
- Ley K. Arrest chemokines. *Microcirculation*. 2003;10:289-295.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004;1:343-350.
- van Lieshout EMM, Peters WHM. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998;19:1873-1875.
- Ligthart GJ, Radl J, Corberand JX, Van Nieuwkoop JA, Van Staalduimen GJ, Van Helmod DJ, Hijmans W. Monoclonal gammopathies in human aging: increased occurrence with age and correlation with health status. *Mech Ageing Dev* 1990;52:235-243.
- Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, Cavallone L, Franceschi C, Caruso C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun* 2002;3:30-33.
- Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, Cavallone L, Marchegiani F, Olivieri F, Franceschi C, Caruso C. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha -308 promoter SNP. *J Med Genet* 2003;40:296-299.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann NY Acad Sci* 2004;1019:346-349.
- Liu H, Harrell LE, Shenvi S, Hagen T, Liu RM. Gender differences in glutathione metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2005;79:861-867.
- Lobby P. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007;65:S140-S146.

- Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *J Neuroimmunol* 1999;97:163-171.
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1521-1535.
- Lord JM, Akbar AN, Kipling D. Telomere-based therapy for immunosenescence. *Trends Immunol* 2002;23:175-176.
- Luciani F, Valensin S, Vescovini R, Sansoni P, Fagnoni F, Franceschi C, Bonafé M, Turchetti G. *J Theor Biol* 2001;213:587-597.
- Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:719-741.
- Lundberg U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:1017-1021.
- Madden KS, Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity. En: *Psychoneuroimmunology*. 2nd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 1991, pp. 283-310. Academic Press, San Diego, CA.
- Maeda K, Tanimoto K, Terada T, Shintani T, Kakigi T. Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. *Neurobiol Aging* 1991;12:161-163.
- Maes M, Bosmans E, Suy E, Minner A, Raus J. Impaired lymphocyte stimulation by mitogens in severely depressed patients. *Br J Psychiatry* 1989;155:793-798.
- Maes M, Stevens W, DeClerck L, Peeters D, Bridts C, Schotte C, Meltzer H, Scharpé S, Cosyns P. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and superoxide release in depressive illness. *Biol Psychiatry* 1992;31:1220-1224.
- Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosmans E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpé S, Smith RS. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 1998;10:313-318.
- Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996;4:471-481.
- Maier SF, Watkins LR, Nance DM. Multiple routes of action of interleukin-1 on the nervous system. En: *Psychoneuroimmunology*. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 2001, pp. 563-585. Academic Press, New York.
- Maier SF, Watkins LR. Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: implications for cancer and cancer treatment. *Brain Behav Immun* 2003;17:S125-S131.

- Maini MK, Casorati G, Dellabona P, Wack A, Beverly PC. T-cell clonality in immune responses. *Immunol Today* 1999;20:262-266.
- Makinodan T, Kay M. Age influence on the immune system. En: *Advances in immunology*. Kunkel HG, Dixon FL, Eds. 1980, Vol 29, pp. 287-330. Academic Press, New York.
- Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. Immunosenescence: a review. *Arch. Gerontol Geriatr* 2001;32:1-14.
- Malorni W, Rivabene R, Santini MT, Donelli G. NAC inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett* 1993;327:75-78.
- Malorni W, Rivabene R, Lucía BM, Ferrara R, Mazzone AM, Cauda R, Paganelli R. The role of oxidative imbalance in progression to AIDS: Effect of the thiol supplier N-acetylcysteine. *AIDS Res Hum Retrovir* 1998;14:1589-1596.
- Mancuso P, McNish RW, Peters-Golden M, Brock TG. Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1899-1913.
- Mandler RN, Biddison WF, Mandler R, Serrate SA. Beta-endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. *J Immunol* 1986;136:934-936.
- Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 2003;43:281-292.
- Marashi V, Barnekow A, Sachser N. Effects of environmental enrichment on males of a docile inbred strain of mice. *Physiol Behav* 2004;82:765-776.
- Maresca B, Cossins AR. Fatty feedback and fluidity. *Nature* 1993;365:606-607.
- Mariani E, Monaco MC, Cattini L, Sinoppi M, Facchini A. Distribution and lytic activity of NK cell subsets in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1994;76:177-187.
- Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L, Facchini A. Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev* 1996;92:195-209.
- Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, Dolzani P, Mazzetti I, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Facchini A. Different IL-8 productin by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1383-1395.
- Mariani E, Pulsatelli L, Neri S, Dolzani P, Meneghetti A, Silvestri T, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. RANTES and MIP-1 α production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjets. *Exp Gerontol* 2002;37:219-226.
- Martínez M, Ferrándiz ML, De Juan E, Miquel J. Age-related changes in glutathione and lipid peroxidation content in mouse synaptic mitochondria: relationship to cytochrome c oxidase decline. *Neurosci Lett* 1994;170:121-124.

- Martínez M, Martínez N. N-acetylcysteine elicited increase in cytochrome c oxidase activity in mice synaptic mitochondria. *Brain Res* 1999;842:249-251.
- Martínez M, Martínez N, Hernández AI, Ferrándiz ML. Hypothesis: Can N-acetylcysteine be beneficial in Parkinson's disease?. *Life Sci* 1999;64:1253-1257.
- Martínez M. N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease. *Brain Res* 2000;859:173-175.
- Marx F, Blasko I, Pavelka M, Grubeck-Loebenstein B. The possible role of the immune system in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 1998;33:871-881.
- Masera RG, Prolo P, Sartori ML, Staurengi A, Griot G, Ravizza L, Dovio A, Chiappelli F, Angeli A. Mental deterioration correlates with response of natural killer (NK) cell activity to physiological modifiers in patients with short history of Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:447-461.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 2000;35:299-305.
- Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev* 2001;122:757-778.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004;430:631-639.
- Mazur A. Biosocial models of deviant behavior among male army veterans. *Biol Psychol* 1995;41:271-293.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;8:367-381.
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol* 1988;76:550-557.
- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* 2006;9:271-276.
- McGregor R, Spagnuolo P, Lentneck A. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin measured with a new assay system. *New Engl J Med* 1974;26:642-646.
- McKee AC, Carreras I, Hossain L, Ryu H, Klein WL, Oddo S, LaFerla FM, Jenkins BG, Kowall NW, Dedeoglu A. Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res* 2008;1207:225-236.
- McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grecis R, McKenzie AN. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 1998;9:423-432.
- McLaughlin KA, Osborne BA, Goldsby RA. The role of oxygen in thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol* 1996;26:1170-1174.
- McMurray RW. Estrogen, prolactin and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol* 2001;1:995-1008.

- Meaney MJ, Aitken DH, Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky R. Effects of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 1988;239:766-768.
- Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 1991;16:85-103.
- Medina S, Del Río M, Víctor VM, Hernánz A, De la Fuente, M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8s, GRP and NPY. *Mech Ageing Dev* 1998;102:249-261.
- Medina S, Del Río M, Hernánz A, De la Fuente M. Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides* 2000;21:1403-1409.
- Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev* 1990;65:375-398.
- Meites J, Goya R, Takahashi S. Why the neuroendocrine system is important in aging processes?. *Exp Gerontol* 1986;22:1-15.
- Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 1996;19:331-338.
- Merrill JE. Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system. En: *Psychoneuroimmunology*. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. 2001, pp. 547-561. Academic Press, New York.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 2006;9:729-731.
- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1462S-1476S.
- Meydani SN, Wu D. Age-associated inflammatory changes: role of nutritional intervention. *Nutr Rev*. 2007;65:S213-S216.
- Michl P, Beikler T, Engelhardt D, Weber MM. Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways. *J Neuroendocrinol* 2000;12:23-28.
- Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997;91:385-395.
- Miller RA. Aging and the immune function. *Int Rev Cytol* 1991;124:187-215.
- Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996;273:70-74.
- Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2001;21:2808-2819.

- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Wiesler-Frank J, Tracey KJ, Martin D, Poole S, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and pro-inflammatory cytokines mediate "anatomically impossible" (mirror image) neuropathic pain. *J Neurosci* 2003;23:1026-1040.
- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P, Caput D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993;362:248-250.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;19:575-591.
- Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. En: *Aging and cell structure*, vol 2. Johnson JE Jr, Ed. 1984, pp. 247-280. Plenum Press, New York.
- Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging. En: *Free radicals, aging and degenerative diseases*. Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J, Eds. 1986, pp. 51-74. Alan R Liss, New York.
- Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 1991;12:99-117.
- Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992;275:209-216.
- Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998;33:113-125.
- Mitchell BL, Ulrich CM, McTiernan A. Supplementetion with vitamins or minerals and immune function: can the elderly benefit? *Nutr Res* 2003;23:1117-1139.
- Miyaishi O, Ando F, Matsuzawa K, Kanawa R, Isobe K. Cancer incidence in old age. *Mech Ageing Dev* 2000;117:47-55.
- Miyaji C, Wanatabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and Natural Killer T cells in centenarians. *Human Immunol* 2000;61:908-916.
- Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 2004;3:177-184.
- Mohacsi A, Fülöp R, Kozlovsky B, Seres I, Leövey A. Superoxide anion production and intracellular free calcium levels in resting and stimulated polymorphonuclear leukocytes obtained from healthy and arteriosclerotic subjects of various ages. *Clin Biochem* 1992;15:15370-15376.
- Mohammed AH, Henricksson BG, So"derstro"m S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* 1993;57:183-191.
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol* 1958;48:254-260.

- Monti D, Salvioli S, Capri M, Malorni W, Straface E, Cossarizza A, Botti B, Piacentini M, Baggio G, Barbi C, Valensin S, Bonafé M, Franceschi C. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. *Mech. Ageing Dev* 2000;121:239-250.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.
- Mooradian AD, Reed RL, Osterweil D, Scuderi P. Detectable serum levels of tumor necrosis factor alpha may predict early mortality in elderly institutionalized patients. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:891-894.
- Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 2007;55:78-88.
- Moriyama Y, Yasue H, Yoshimura M, Mizumo Y, Nishiyama K, Tsunoda R, Kawano H, Kugiyama K, Ogawa H, Saito Y, Nakao K. The plasma levels of dehydroepiandrosterone are decreased in patients with chronic heart failure in proportion to the severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1834-1840.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.
- Mrak RE, Sheng JGW, Griffin ST. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenetic implications. *Hum Pathol* 1995;26:816-823.
- Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors and atherosclerosis: key contributors in disease and health? *Immunol Res* 2006;34:193-209.
- Murciano C, Yáñez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:214-221.
- Murphy DG, DeCarli C, Schapiro MB, Rapoport SI, Horwitz B. Age-related differences in volumes of subcortical nuclei, brain matter, and cerebrospinal fluid in healthy men as measured with magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 1992;49:839-845. Erratum en: *Arch Neurol* 1994;51:60.
- Murphy WJ, Longo DL. Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent. *Immunol Today* 2000;21:211-213.
- Müller MB, Holsboer F, Keck ME. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides* 2002;36:117-131.
- Navarro A, Gómez C, Sánchez-Pino MJ, González H, Báñez M, Boveris AD, Boveris A. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1392-R1399.
- Nicoll JAR, Mrak RE, Graham DJ, Steward J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WST. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000;47:365-368.

- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997;43:1209-1214.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999;39:569-578.
- Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanoh T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 1989;44:1655-1664.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neurone* 2003a;39:409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003b;24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Green, KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3046-3051.
- Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:269-275.
- Ohmori Y, Hamilton TA. IFN- γ selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/gro/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1994;153:2204-2212.
- Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2009;59:278-292.
- Omara FO, Blakley BR, Bernier J, Fournier M. Immunomodulatory and protective effects of NAC in mitogen-activated splenocytes in vitro. *Toxicology* 1997;116:219-226.
- Ortega E, Garcia JJ, De La Fuente M. Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000a;85:519-525.
- Ortega E, García JJ, De la Fuente M. Modulation of adherence and chemotaxis of macrophage by norepinephrine. Influence of ageing. *Mol Cell Biochem* 2000b;203:113-117.
- Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D, Franceschi C. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:224-240.
- Otsuka T, Miyajima A, Brown N, Otsu K, Abrams J, Saeland S, Caux C, de Waal Malefijt R, de Vries J, Meyerson P. Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3. Induction of IL-3 mRNA in human T cell clones. *J Immunol* 1988;140:2288-2295.
- Ottaviani E, Franceschi C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine system. *Immunol Today* 1997;18:169-174.

- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444-448.
- Paganelli R, Quinti I, Fagiolo U, Cossarizza A, Ortolani C, Guerra E, Sansoni P, Pucillo LP, Scala E, Cozzi E, Franceschi C. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin Exp Immunol* 1992;90:351-354.
- Paganelli R, Di Iorio A, Patricelli L, Ripani F, Sparvieri E, Faricelli R, Iarlori C, Porreca E, Di Gioacchino M, Abate G. Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* 2002;37:257-263.
- Pahlavani MA, Richardson A. The effect of age on the expression of interleukin-2. *Mech. Ageing Dev* 1996;89:125-154.
- Pahlavani MA, Harris MD. Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998;25:903-913.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev* 1999;106:283-296.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, Lopez-Torres M, Barja G. Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000;55:B286-291.
- Pamplona R, Barja G. Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En: *Aging at the Molecular Level*. von Zglinicki T, Ed. 2003, pp. 47-64. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Requena J, Barja G. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol* 2004;39:725-733.
- Pamplona R, Barja G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* 2007;6:189-210.
- Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:1249-1262.
- Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol* 2006;84:333-341.
- Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Di Lucia P, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. Beta-2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin-12. *J Clin Invest* 1997;100:1513-1519.
- Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;45:666-668.

- Park EM, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:392-401.
- Park JW, Choi CH, Kim MS, Chung MH. Oxidative status in senescence accelerated mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;51:B337-B345.
- Park HR, Jo SK, Jung U, Yee ST. Restoration of the immune functions in aged mice by supplementation with a new herbal composition, HemoHIM. *Phytother Res* 2008;22:36-42.
- Parker CR Jr. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids* 1999;64:640-647.
- Paul WE. Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-70.
- Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-51.
- Pawelec G, Effros R, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R. T cells and aging. *Front Biosci* 1999;4:216-269.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. T-cells and aging. *Front Biosci* 2002;7:d1056-d1183.
- Paylor R, Morrison SK, Rudy JW, Waltrip LT, Wehner JM. Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young rats. *Behav Brain Res* 1992;52:49-59.
- Payne LC, Weigent DA, Blalock JE. Induction of pituitary sensitivity to interleukin-1: a new function for corticotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:480-484.
- Pedersen B, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Krzywdowski K, Toft A, Sondegaard A, Petersen E, Ibfelt T, Schjerling P. Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med* 2000;21:S4-S21.
- Pedersen WA, Culmsee C, Ziegler D, Herman JP, Mattson MP. Aberrant stress response associated with severe hypoglycemia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 1999;13:159-165.
- Pedersen WA, Wan R, Mattson MP. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems. *Mech Ageing Dev* 2001;122:963-983.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-167.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312:724-729.
- Pérez-Álvarez L, Baeza I, Arranz L, Marco EM, Borcel E, Guaza C, Viveros MP, De la Fuente M. Behavioural, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev Comp Immunol* 2005;29:965-976.
- Perry HM. The endocrinology of aging. *Clin Chem* 1999;45:1369-1376.

- Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 2001;79:350-357.
- Piccini MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995;155:128-133.
- Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 1988;448:106-114.
- Por SB, Bennett EL, Bondy SC. Environmental enrichment and neurotransmitter receptors. *Behav Neural Biol* 1982;34:132-140.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977;229:327-336.
- Portero-Otin M, Requena JR, Bellmunt MJ, Ayala V, Pamplona, R. Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Exp Gerontol* 2004;39:1527-1535.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev* 2000;1:191-198.
- Pressman S, Cohen S, Miller GE, Barkin A, Rabin BS, Treanor JJ. Loneliness, social network size, and immune response to influenza vaccination in college freshmen. *Health Psychol* 2005;24:297-306.
- Provinciali M, Distefano G, Fabris BN. Improvement in the proliferative capacity and natural killer cell activity of murine spleen lymphocytes by thyrotropin. *Int J Immunopharmacol* 1992;14:865-870.
- Puerto M, Guayerbas G, Víctor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:797-804.
- Puerto M, Guayerbas G, Álvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005;165:33-40.
- Pugh CR, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. The immune system and memory consolidation: a role for cytokine IL-1 β . *Neurosci. Biobehav Rev* 2001;25:29-41.
- Puri RN, Meister A. Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5228-5260.
- Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1 beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neurosci* 1998;83:281-293.
- Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev* 2008;7:34-42.

- Rafi A, Castle SC, Uyemura K, Makinodan T. Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistamines. *Biomed Pharmacother* 2003;57:246-250.
- Ramer-Quinn DA, Swanson MA, Lee WT, Sanders VM. Cytokine production by naive and primary effector CD4(+) T cells exposed to norepinephrine. *Brain Behav Immun* 2000;14:239-255.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur J Pharmacol* 2008;589:173-175.
- Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, Kanda S, Hayashi T, Iguchi A. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1188-1196.
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang Y-P, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12880-12884.
- Rasmuson S, Olsson T, Henricksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH. Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;53:285-290.
- Rasmuson S, Näsman B, Carlström K, Olsson T. Increased levels of adrenocortical and gonadal hormones in mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002;13:74-79.
- Rattan SI. Gerontogenes: real or virtual? *FASEB J* 1995;9:284-286.
- Rattan SI. Biogerontology: the next step. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:282-290.
- Rattan SI. Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol Chem* 2008a;389:267-272.
- Rattan SI. Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 2008b;7:63-78.
- Receputo G, Rapisarda R, Motta L. Centenarians: health status and life conditions. *Ann Ital Med Int* 1995;10:41-45.
- Refsgaard HH, Tsai L, Stadtman ER. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:611-616.
- Remarque EJ, Bollen ELEM, Weverling-Rijnsburger AWE, Laterveer JC, Blauw GJ, Westendorp RGJ. Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. *Exp Gerontol* 2001;36:171-176.
- Renauld JC, Goethals A, Houssiau F, Merz H, Van Roost E, Van Snick J. Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene. *J Immunol* 1990;144:4235-4241.
- Renner MJ, Rosenzweig MR. Object interactions in juvenile rats (*Rattus norvegicus*): effects of different experimental histories. *J Comp Physiol* 1986;100:229-236.
- Renner MJ. Experience-dependent changes in exploratory behavior in the adult rat (*Rattus norvegicus*): overall activity level and interactions with objects. *J Comp Psychol* 1987;101:94-100.

- Renshaw W, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002;169:4697-4701.
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J* 1997;322:317-325.
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:69-74.
- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 2003;25:221-226.
- Revskey S, Redei E. Decreased in vitro sensitivity to dexamethasone in corticotropes from middle-age rats. *Exp Gerontol* 2000;35:237-242.
- del Rey A, Kabiersch A, Petzoldt S, Besedovsky HO. Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo. *J Neuroimmunol* 2002;127:44-53.
- Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G. Molecular mechanism of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* 2002;45:361-368.
- Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res* 2005;39:535-543.
- Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987;44:175-189.
- de Rijke JM, Schouten LJ, Hillen HF, Kiemeny LA, Coebergh JW, van den Brandt PA. Cancer in the very elderly Dutch population. *Cancer* 2000;89:1121-1133.
- Rivest S. What is the cellular source of prostaglandins in the brain in response to systemic inflammation: facts and controversies. *Mol Psychiatry* 1999;4:501-508.
- Robbins TW. Handbook of Psychopharmacology. Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH, Eds. 1977, vol. 7, pp. 37-82. Plenum, New York.
- Roberts RL, Aroda VR, Ank BJ. N-acetylcysteine enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity in neutrophils and mononuclear cells from healthy adults and human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1995;172:1492-1502.
- Rosenblitt JC, Soler H, Johnson SE, Quadagno DM. Sensation seeking and hormones in men and women: exploring the link. *Horm Behav* 2001;40:396-402.
- Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 1996;78:57-65.
- Roszman TL, Jackson RJ, Cross MJ, Titus WR, Markesberry WR, Brooks H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences of immune function. *J Immunol* 1985;135:769-772.

- Roy V, Belzung C, Delaure C, Chapillon P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* 2001;74:313-320.
- Rudman D, Feller AG, Cohn L, Shetty KR, Rudman IW, Draper MW. The effect of human growth hormone as body composition in elderly men. *Horm Res* 1991;36:73-81.
- Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otin M, Requena JR, Barja G, Pamplona, R. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 2005;126:1106-1114.
- Sabroe I, Whyte MK. Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1492-1495.
- Sacchetta P, Di Cola D, Federici G. Alkaline hydrolysis of N-ethylmaleimide allows a rapid assay of glutathione disulfide in biological samples. *Anal Biochem* 1986;154:205-208.
- Sacerdote P, Panerai AE, Frattola L, Ferrarese C. Benzodiazepine-induced chemotaxis is impaired in monocytes from patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:243-249.
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Mishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristic of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol* 1999;34:959-970.
- Sadowska AM, Manuel-y-Keenoy B, Vertongen T, Schippers G, Radomska-Lesniska D, Heytens E, De Backer WA. Effect of N-acetylcysteine on neutrophil activation markers in healthy volunteers: In vivo and in vitro study. *Pharmacol Res* 2006;53:216-225.
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008;7:83-105.
- Salvioli S, Capri M, Valensin S, Tieri P, Monti D, Ottaviani E, Franceschi C. Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr Pharm Des* 2006;12:3161-3171.
- Samuels DC. Life span is related to the free energy of mitochondrial DNA. *Mech Ageing Dev* 2005;126:1123-1129.
- Sansoni P, Fagnoni F, Vescovini R, Mazzola M, Brianti Y, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Cossarizza A, Monti D, Franceschi C, Passeri M. T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians. *Mech. Ageing Dev* 1997;96:127-136.
- Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:582-599.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 1986;7:284-301.
- Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y. Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques,

- slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch* 2002;441:358-367.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000;32:189-198.
- Savino W, Dardenne M. Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol Today* 1995;16:318-322.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimerdisease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173-177.
- Schinkowski K, Leutner S, Müller WE, Eckert A. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging* 2000;21:661-670.
- Schmid K, Haslbeck M, Buchner J, Somoza V. Induction of heat shock proteins and the proteasome system by casein-N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)lysine in Caco-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2008;1126:257-261.
- Schubert T, Muller WE. N-formil-methionyl-leucil-phenylalanine induced accumulation of inositol phosphate indicates the presence of oligopeptide chemoattractant receptors on circulating human lymphocytes. *FEBS Letters* 1989;257:174-176.
- Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 2000;21:110-113.
- Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull* 2006;70:8-14.
- Segovia G, Arco AD, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm* 2009; En prensa.
- Sehgal PB, May LT, Tamm I, Vilcek J. Human beta 2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science* 1987;235:731-732.
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann NY Acad Sci* 2000;924:17-25.
- Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 1936;17:234-248.
- Selye H. The stress of life: revised edition. 1975. McGraw Hill Book Co., New York.
- Shalit F, Sredni B, Brodie C, Kott E, Huberman M. T lymphocyte subpopulations and activation markers correlate with severity of Alzheimer's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:246-250.

- Shanmugam N, Figarola JL, Li Y, Swiderski PM, Rahbar S, Natarajan R. Proinflammatory effects of advanced lipoxidation end products in monocytes. *Diabetes* 2008;57:879-888.
- Sharp PE, McNaughton BL, Barnes CA. Enhancement of hippocampal field potentials in rats exposed to a novel, complex environment. *Brain Res* 1985;339:361-365.
- Sharp PE, Barnes CA, McNaughton BL. Effects of aging on environmental modulation of hippocampal evoked responses. *Behav Neurosci* 1987;101:170-178.
- Shearman LP, Rosko KM, Fleischer R, Wang J, Xu S, Tong XS, Rocha BA. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 2003;14:573-582.
- Shock NW. Physiological and chronological age. En: *Aging its chemistry*. Dietz AA, Ed. 1979. The American Association for Clinical Chemistry.
- Shukitt-Hale B, Smith DE, Meydani M, Joseph JA. The effects of dietary antioxidants on psychomotor performance in aged mice. *Exp Gerontol* 1999;34:797-808.
- Shukitt-Hale B, Carey A, Casadesus G, Galli RL, Joseph JA. Mechanism involved in blueberry enhancements of motor and cognitive function in young and old rats. *Soc Neurosci Abs* 2003;29:633.14.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986;25:1058-1071.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med*. 1999;27:916-921.
- Simons RJ, Reynolds HY. Altered immune status in the elderly. *Semin Respir Infect* 1990;5:251-259.
- Small SA, Nava AS, Perera GM, Delapaz R, Stern Y. Evaluating the function of hippocampal subregions with high-resolution MRI in Alzheimer's disease and aging. *Microsc Res Tech* 2000;51:101-108.
- Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol Rev* 1980;51:337-57.
- Smith KA. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science* 1988;240:1169-1176.
- Snyderman R, Pike MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann Rev Immunol* 1984;2:257-281.
- Solana R, Villanueva JL, Peña J, De la Fuente M. Cell mediated immunity in ageing. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1991;99:1-4.
- Solana R, Pawelec G. Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 1998;102:115-129.
- Solana R, Alonso MC, Peña J. Natural Killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 1999;34:435-443.
- Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 2000;18:1613-1620.
- Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006;24:491-494.
- Soliven B, Albert J. Tumor necrosis factor modulates Ca^{+2} currents in cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* 1992;12:2665-2671.

- Sorachi K, Kumagai S, Sugita M, Yodoi J, Imura H. Enhancing effects of 17 β estradiol on human NK cell activity. *Immunol Lett* 1993;36:31-35.
- Spaulding C, Gwo N, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 1999;34:633-644.
- Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 2007;28:1163-1169.
- Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:135-140.
- Stanta G, Campagner L, Cavallieri F, Giarelli L. Cancer of the oldest old. What we have learned from autopsy studies. *Clin Geriatr Med* 1997;13:55-68.
- Stefanski V, Grüner S. Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain Behav Immun* 2006;20:369-377.
- Steinhauser ML, Kunkel SL, Hogaboam CM, Evanoff H, Strieter RM, Lukacs NW. Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-1 alpha production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. *J Leuk Biol* 1998;64:636-641.
- Stichel CC, Luebbert H. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging* 2007;28:1507-1521.
- Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP. Tumor necrosis factor- α in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 1993;45:175-182.
- Stout RD, Suttles J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* 2005;205:60-71.
- Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Schölmerich J, Falk W, Lang B. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2012-2017.
- Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol* 2000;109:2197-2202.
- Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Schölmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1591-1611.
- Strehler BL. Time, cells and aging. 1977. Academic Press, New York.
- Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002;40:133-139.

- Sunday L, Tran MM, Krause DN, Duckles SP. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E261-E267.
- Sunday L, Osuna C, Krause DN, Duckles SP. Age alters cerebrovascular inflammation and effects of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2333-H2340.
- Sutmuller R, Garritsen A, Adema GJ. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann Rheum Dis* 2007;66:91-95.
- Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* 1999;190:1561-1572.
- Svec F, Porter JR. Dehydroepiandrosterone: a nutritional supplement with actions in the central nervous system. *Nutr Neurosci* 1998;1:9-19.
- Szabo P, Shen S, Weksler ME. Age-associated defects in B lymphocyte development. *Exp Gerontol* 1999;34:431-434.
- Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33:29-36.
- Taishi P, Chen Z, Obal F, Hansen M, Zhang J, Fang J, Krueger J. Sleep-associated changes in interleukin-1-beta mRNA in the brain. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:793-798.
- Tang Y, Di Pietro L, Feng Y, Wang X. Increased TNF-alpha and PFI2, but not NO release from macrophages in 18 months old rats. *Mech Ageing Dev* 2000;114:79-88.
- Tarazona R, Solana R, Ouyang Q, Pawelec G. Basic biology and clinical impact of immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:183-189.
- Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A. Intracerebral production of tumour necrosis factor- α , a local neuroprotective agent in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Clin Immunol* 1999;19:223-230.
- Tato CM, Mason N, Artis D, Shapira S, Caamano JC, Bream JH, Liou HC, Hunter CA. Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma. *Int Immunol* 2006;18:505-513.
- Tedla N, Wang HW, McNeil HP, DiGirolamo N, Hampartzoumian T, Wakefield D, Lloyd A. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β . *J Immunol* 1998;161:5663-5672.
- Terao A, Oikawa M, Saito M. Cytokine-induced change in hypothalamic norepinephrine turnover: involvement of corticotropin-releasing hormone and prostaglandins. *Brain Res* 1993;622:257-261.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572-580.

- Thery C, Mallat M. Influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α on the growth of microglial cells in primary cultures of mouse cerebral cortex: involvement of colony-stimulating factor 1. *Neurosci Lett* 1993;150:195-199.
- Thorsell A, Slawecki CJ, El Khoury A, Mathe AA, Ehlers CL. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:28-34.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969;17:502-522.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Jirillo E, Antonaci S. Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech Ageing Dev* 1999;110:195-205.
- Touma C, Ambrée O, Görtz N, Keyvani K, Lewejohann L, Palme R, Paulus W, Schwarze-Eicker K, Sachser N. Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:893-904.
- Toussaint O, Remacle J. Stress and energy metabolism in age-related processes. En: *Molecular gerontology. Research status and perspectives*. Rattan SI, Toussaint O, Eds. 1996, pp. 87-110. Plenum Press, New York.
- Townsend JM, Fallon GP, Matthews JD, Smith P, Jolin EH, McKenzie NA. IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* 2000;13:573-583.
- Trebilcock GU, Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated T lymphocytes during aging. *Gerontology* 1996;42:137-146.
- Tringali G, Mirtella A, Mancuso C, Guerriero G, Preziosi P, Navarra P. The release of immunoreactive interleukin-1 beta from rat hypothalamic explants is modulated by neurotransmitters and corticotropin-releasing hormone. *Pharmacol Res* 1997;36:269-273.
- Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol* 2006;119:307-316.
- Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM. Amyloid B-peptide: the inside story. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:231-239.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanism of action. *Physiol Res* 1999;79:1-71.
- Uehara A, Gottschall PE, Dahl RR, Arimura A. Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin releasing factor. *Endocrinology* 1987;121:1580-1582.

- Urban T, Akerlund B, Jarstrand C, Lindeke B. Neutrophil function and glutathione-peroxidase (GSH-px) activity in healthy individuals after treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Biomed Pharmacother* 1997;51:388-390.
- Vallejo C, Hernanz A, De la Fuente M. Relation between plasma cortisol levels and blood leucocyte function in elderly people. Effect of moderate physical exercise. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:248.
- Varadhachary AS, Perrow SN, Hu C, Ramanarayanan M, Salgame P. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5778-5783.
- Vázquez C, Sanz J. Fiabilidad y validez de la versión española del Inventario para la Depresión de Beck de 1978 en pacientes con trastornos psicológicos. *Clin Salud* 1999;10 59-81.
- Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002;1:360-364.
- Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1:983-993.
- Víctor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Río M, De la Fuente M. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors* 1999;10:347-357.
- Víctor VM, Guayerbas N, De la Fuente M. Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Mol Cel Biochem* 2002;229:107-111.
- Víctor VM, De la Fuente M. N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res* 2002;36:33-45.
- Víctor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic Res* 2003;37:19-27.
- Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Rad Res* 2003a;37:919-929.
- Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int Immunopharmacol* 2003b;3:97-106.
- Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327-347.
- Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1172-1176.
- Viña J. Glutathione: metabolism and physiological functions. 1990, CRC press Boca Raton, Florida.
- Viña J, Borrás C, Gambini J, Satre J, Pallardó FV. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *FEBS Lett* 2005;23:2541-2545.

- Viña J, Borrás C, Miquel J. Critical review: Theories of aging. *IUBMB Life* 2007;59:249-254.
- Viña J, Sastre J, Pallardó FV, Gambini J, Borrás C. Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens. *Biol Chem* 2008;389:273-277.
- Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunology* 2001;104:431-438.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?. *J Neurochem* 2000;74:457-471.
- Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 2001;114:80-88.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:157-162.
- Wack A, Cossarizza A, Heltai S, Barbieri D, D'Addato S, Franceschi C, Dellabona P, Casorati G. Age-related modifications of the human alpha beta T cell repertoire as a consequence of clonal expansion. *Int Immunol* 1998;10:1281-1288.
- Walford RL. The immunological theory of aging. 1969, pp. 1-248. Musksgaard, Copenhagen.
- Walsh RN, Cummins RA. The open-field test. A critical review. *Psicol Bull* 1976;83:482-504.
- Walston J, Fried LP. Frailty and the older man. *Med Clin North Am* 1999;83:1173-1194.
- Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schuffer W, Fassbender K. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:947-956.
- Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 2002;67:161-172.
- Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *J Immunol* 1995;154:1909-1918.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:M45-M48.
- Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ, Engelhardt D. Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells. *Endocrinology* 1997;138:2207-2210.
- Weksler ME, Schwab R, Ai-hao D. Aging and the immune system. En: *Clinical Immunology: Principal and practice*. Rich RR, Ed. 1996, pp: 789-795. Mosby Year Book Inc., St Louis.
- Weksler ME. Changes in B cell repertoire with age. *Vaccine* 2000;18:1624-1628.
- Weksler ME, Szabo P. The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol* 2000;20:240-249.
- Weindruch R, Sohal RS. Caloric intake and aging. *New Engl Med* 1997;337:986-994.

- Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 1984;132:656-661.
- Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD, Koulen P, Simpkins JW. Estrogen attenuates nuclear factor- κ B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004;1008:147-154.
- Wenish C, Patruta S, Daxbock F, Krause R, Horl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2000;67:40-45.
- Wesselingh SL, Power C, Glass JD, Tyor WR, McArthur JC, Farber JM, Griffin JW, Griffin DE. Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann Neurol* 1993;33:576-582.
- Weyand CM, Brandes JC, Schmidt D, Fulbright JW, Goronzy JJ. Functional properties of CD4+CD28- T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev* 1998;102:131-147.
- Whisler RL, Williams JW Jr, Newhouse YG. Human B cell proliferative responses during aging. Reduced RNA synthesis and DNA replication after signal transduction by surface immunoglobulins compared to B cell antigenic determinants CD20 and CD40. *Mech Ageing Dev* 1991;61:209-222.
- Widman DR, Rosellini RA. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol Behav* 1990;47:57-62.
- Wienstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1998;102:274-282.
- Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B, Ferguson FG. Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study. *Mech Ageing Dev* 1998;102:187-198.
- Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Lofgren S, Nilsson BO, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:556-565.
- Wilder RL. Hormones, pregnancy and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 1998;840:45-50.
- Wilkinson CW, Petrie EC, Murray SR, Colasurdo EA, Raskind MA, Peskind ER. Human glucocorticoid feedback inhibition is reduced in older individuals: evening study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:545-550.
- Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957;2:397-411.
- Williams JR. The effects of dehydroepiandrosterone on carcinogenesis, obesity, the immune system and aging. *Lipids* 2000;35:325-331.
- Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Bock G, Widner B, Fuchs D. 7, 8-Dihydroneopterin-induced apoptosis in Jurkat T lymphocytes: a comparison with anti-Fas- and hydrogen peroxide-mediated cell death. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1181-1187.

- Wittchen HU, Boyer P. Screening for anxiety disorders: sensitivity and specificity of the anxiety screening questionnaire (ASQ-15). *Br J Psychiatry* 1998;173:109-126.
- Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD. Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med* 1999;77:769-780.
- Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A. Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions. *Pediatr Res* 2000;48:369-373.
- Wolf OT, Kudielka BM. Stress, health and ageing: a focus on postmenopausal women. *Menopause Int* 2008;14:129-133.
- Wong YL, Piliavin I. Stressors, resources, and distress among homeless persons: a longitudinal analysis. *Soc Sci Med* 2001;52:1029-1042.
- Wu J, Levy EM, Black PK. 2-mercaptoethanol and N-acetylcysteine enhance T cell colony formation in AIDS and ARC. *Clin Exp Immunol* 1989;77:7-10.
- Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci* 2000;66:1827-1838.
- Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *J Am Med Assoc* 1998;279:688-695.
- Yang CS, Chou ST, Liu L, Tsai PJ, Kuo JS. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1995;674:23-30.
- Yang PY, Rui YC, Jin YX, Li TJ, Qiu Y, Zhang L, Wang JS. Antisense oligodeoxynucleotide inhibits vascular endothelial growth factor expression in U937 foam cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:610-614.
- Yoon SO, Yun CH, Chung AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002;123:1597-1604.
- Yoshimoto T, Nakanishi K. Roles of IL-18 in basophils and mast cells. *Allergol Int* 2006;55:105-113.
- Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process. *Neurosci Bull* 2007;23:125-130.
- Zaragoza A, Diez-Fernández C, Álvarez AM, Andrés D, Cascales M. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidants defenses system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2000;1496:183-195.

- Zhang X, Brunner T, Caster L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, Swain SL. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/Fas-L mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997;185:1837-1849.
- Zhao B, Schwartz J. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci. Res* 1998;52:7-16.
- Zhou D, Shanks N, Riechman SE, Liang R, Kusnecov AW, Rabin BS. Interleukin 6 modulates interleukin-1- and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Neuroendocrinology* 1996;63:227-236.
- Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res* 2006;169:10-20.
- Zietz B, Hrach S, Schölmerich J, Straub RH. Differential age-related changes of hypothalamus - pituitary - adrenal axis hormones in healthy women and men - role of interleukin 6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:93-101.
- Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Age-related decrease in accessory cell function of human alveolar macrophages. *J Invest Med* 1999;47:51-56.
- Zorrilla E, Redei E, Derubeis RJ. Reduced cytokine levels and T-cell function in healthy males: relation to individual differences in subclinical anxiety. *Brain Behav Immun* 1994;8:293-312.
- Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, Rossi L, Munari MR, Zurlo A, Volpato S, Atti AR, Blè A, Fellin R. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Psychiatr Res* 2007;41:686-693.

Anexo

A continuación se enumera la relación de trabajos derivados de la presente tesis doctoral:

1. **Arranz L**, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007;62:1-8.
2. **Arranz L**, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. Changes with ageing in immune cell and plasma glutathione levels. Effect of N-acetylcysteine administration. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2007;42:96-102.
3. Zambrana Z, Marco EM, **Arranz L**, De Castro NM, Viveros MP, De la Fuente M. Influence of aging and enriched environment on motor activity and emotional responses in mice. *Ann NY Acad Sci* 2007;1100:543-552.
4. **Arranz L**, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1252-1262.
5. Giménez-Llort L, **Arranz L**, Maté I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:331-343.
6. **Arranz L**, de Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. Impaired immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:251-260.
7. **Arranz L**, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009;44:137-142.
8. **Arranz L**, De Castro NM, Baeza I, Caamaño J, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leucocyte oxidative stress in long-lived mice: Key role of nuclear factor-kappaB. *Aging Cell* 2009. Enviado.
9. **Arranz L**, Lord JM, De la Fuente M. Low chronic inflammatory status and preserved Th1/Th2 cytokine responses in naturally long-living mice. *J Immunol* 2009. Enviado.
10. **Arranz L**, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. Differential expression of Toll-like receptors on peritoneal leucocyte populations from long-lived and non-selected younger old mice. *Exp Gerontol* 2009. Enviado.

11. **Arranz L**, Naudí A, Pamplona R, De la Fuente M. Naturally long-living mice are highly resistant to oxidation-derived molecular damage. *Free Radic Biol Med*. En preparación.
12. **Arranz L**, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment. Long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res*. En preparación.
13. **Arranz L**, Rattan SIS, De la Fuente M. Changes in chymotrypsin- and caspase-like activities of the 20S proteasome with aging and longevity. *Biogerontology*. En preparación.
14. Giménez-Llort L, **Arranz L**, Maté I, De la Fuente M. “Soledad”, a mouse model of social isolation in the elderly, accelerates age-related cognitive, behavioral and immune impairments. *Biol Psychiatry*. En preparación.
15. **Arranz L**, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M, Giménez-Llort L. Effect of environmental enrichment on the neuroimmunoendocrine aging of male and female triple-transgenic 3xTg-AD mice for Alzheimer’s disease. *J Neuroimmunol*. En preparación.

Original articles

Impairment of several immune functions in anxious women

Lorena Arranz, Noelia Guayerbas, Mónica De la Fuente*

Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Received 12 January 2006; received in revised form 11 July 2006; accepted 18 July 2006

Abstract

Objective: Controversial results concerning immune function changes taking place in anxious subjects have been obtained. The aim of the present work was to study immune function in a group of anxious women. **Methods:** Thirty-three anxious and 33 non-anxious age-matched women were included. Anxiety levels were determined by the Beck Anxiety Inventory. Peripheral blood samples were collected, and several leukocyte functions, as well as cytokine release, were studied. Plasma cortisol levels and total antioxidant capacity were also evaluated. **Results:** The results showed diminished chemotaxis, phagocytosis, lymphoproliferation

in response to phytohemagglutinin mitogen, natural killer activity, and interleukin-2 release, and augmented superoxide anion levels and tumor necrosis factor- α release in anxious women. Plasma cortisol was increased, while total antioxidant capacity was lowered in those subjects. **Conclusions:** The findings suggest impaired immune function and cytokine release in anxious women. This might be related to increased cortisol secretion, which would lead to oxidative stress reflected in lowered plasma total antioxidant capacity.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Anxiety; Immune functions; Cytokines; Cortisol; Total antioxidant levels; Women

Introduction

The hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis is a neuroendocrine system of great interest for the study of the relationship between stress and health. Immune cells exhibit receptors for many neuroendocrine products, such as those from the HPA axis [1]. Besides, the principal glucocorticoid modulating anxiety is cortisol [2], which causes changes in immune cellular functions [3]. Accordingly, many authors suggest that anxiety may negatively affect lymphocyte proliferative response to phytohemagglutinin (PHA) and to concanavalin A, and natural killer (NK) cell activity, although it may also be associated with a lack of significant differences or even increased functions. This last response is considered a transient phenomenon occurring prior to immune down-regulation, indicating the body's defense

against stressors and thus dealing with state (discrete response to a specific threatening situation) anxiety as opposed to trait (general tendency to experience anxiety symptoms when faced with nondangerous situations) anxiety [4–7]. Nevertheless, research dealing with the relation of anxiety to immunity is scarce [5].

Cytokines are known to orchestrate the complex network of cellular interactions that regulate immune response. Some studies have shown a decreased PHA-induced interleukin-2 (IL-2) production [6] in anxious patients, while several found a positive correlation [4]. Proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), appear to be increased [8] in those patients.

Some authors have hypothesized on the important role that phagocytic cells play in immune changes experienced by subjects with emotional disturbances [9]. Reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytes are important for host defense and as intracellular messengers needed for cellular functioning. However, excessive production and/or release of ROS is deleterious for immune cells, leading to oxidative stress [10]. Cell homeostasis and, consequently, cell functions would be compromised by an imbalance

* Corresponding author. Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Madrid Complutense University, C/ José Antonio Novais 2, Madrid 28040, Spain. Tel.: +34 91 3944989; fax: +34 91 3944935.

E-mail address: mondelaf@bio.ucm.es (M. De la Fuente).

between oxidants and antioxidants [11]. Therefore, adequate amounts of neutralizing antioxidants are required to prevent cellular damage, especially in immune cells [10].

In view of controversial results observed with regard to immune function changes exhibited by anxious subjects, the present work deals with the study of some key lymphocyte and neutrophil functions, and of cytokine release. These functions have previously been evaluated by our research group in anxious mice, showing alterations that have correlated with the life span of the animals [12–14]. Moreover, several of the above functions have been shown to be good health markers [12–15]. In addition, in view of the above, plasma cortisol and total antioxidant capacity were also studied.

Methods

Subjects

The study was performed on 33 women aged 43.29 ± 2.09 years who showed high levels of anxiety (53.8 ± 7.1 ; $P < .001$ with respect to controls), as determined by the Beck Anxiety Inventory (BAI) [16–18]. The control group was composed of 33 nonanxious women (43.32 ± 3.43) of the same age (43.29 ± 2.09 years) to avoid age-related and gender-related differences.

Participants were individuals who responded to e-mail, press advertisements, and posters. All subjects were Spanish and were recruited from the population of Madrid. The inclusion criteria were as follows: (a) female gender; (b) age of 30–50 years; and (c) exhibiting a high level of anxiety or absence of anxiety. None of the participants received any kind of psychopharmacological treatment or psychotherapy. Exclusion criteria consisted of malnourishment, pregnancy, severe allergies, immunodeficiency or autoimmune diseases, neoplasia, rheumatic fever, diabetes, seizures, endocrine disorders, anemia, radiation therapy, chemotherapy, intake of adrenal corticosteroids or estrogen replacement therapy, smoking, consumption of alcohol or drugs, or performance of endurance training shortly before admission. Women who had recently been diagnosed with infectious diseases, had undergone any surgical treatment, consumed immune-modulating drugs, showed pathological laboratory findings, were unable to complete the evaluation protocol or were unable to speak, read, or write in Spanish were also excluded. Considering that menstrual status may influence immunity, it was necessary for participants to be neither ovulating nor menstruating. A structured clinical interview was conducted previous to the psychological questionnaire. Women showing depressive symptoms were excluded from the study.

As regards the sociodemographic characteristics of the sample, all women had completed at least basic school education (≥ 12 years of education) and belonged to the middle and high classes.

All participants received information on the purpose of the study, and they gave their written consent for the use of their blood samples for academic research. All procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki. Blood samples (9 ml of peripheral blood drawn by vein puncture) were collected from 9:00 am to 10:00 am (in tubes with citrate; BD Vacutainer Systems) to control the effect of circadian variations on immune parameters. Following the conduct of the psychological questionnaire (Spanish version), blood samples were collected.

BAI

The BAI is a self-applied instrument used to assess anxiety, especially its physical effects [16–18]. The BAI does not specifically distinguish between trait anxiety and state anxiety; however, its high test–retest reliability suggests that it functions as a trait measure. It contains 21 items involving a broad range of symptoms associated with clinical manifestations of anxiety, such as nervousness, inability to relax, headache, and tachycardia. Each item consists of four statements representing varying degrees of severity. Subjects were asked to select the statement that best reflected their experience during the week previous to performing the test, including the present moment. The duration of administration was 5 min. A sum score was calculated, with higher scores indicating higher levels of anxious symptoms (0–9 = *normal or low anxiety*; 30–63 = *high anxiety*). The BAI differentiates between anxiety and depression, and also between anxious subjects and healthy controls, but not among anxiety disorders. It was specifically designed to differentiate between behavioral, emotional, and physiological symptoms in individuals with anxiety and depression. In order to achieve that goal, the authors incorporated items that are specific to the physiological and cognitive symptoms of anxiety and that are independent of the symptoms of depression. It has a test–retest reliability of $r = .67-.93$, and its internal consistency is Cronbach's $\alpha = .90-.94$.

Adherent capacity

For adherent capacity measurement, the method described by De la Fuente et al. [19] was used. The results were expressed as the adherence index (AI):

$$AI = \frac{\text{Cells/ml}_{\text{initial}} - \text{Cells/ml}_{\text{effluent}}}{\text{Cells/ml}_{\text{initial}}} \times 100.$$

TNF- α release

TNF- α release was measured on culture supernatants of total blood in the presence of lipopolysaccharide (LPS) by following a previously described method [20]. TNF- α level was measured using an ELISA kit (DIACLONE Research, Besançon, France), with a minimum detectable dose

of $\text{TNF-}\alpha$ <10 pg/ml. The results were expressed as picograms per milliliter.

Separation of neutrophils and lymphocytes

Cells were obtained by following a previously described method [21]. Collected cells, containing 98% neutrophils or lymphocytes, were diluted to the corresponding final concentrations for the development of each assay.

Chemotaxis

Chemotaxis was evaluated according to the technique described by De la Fuente et al. [19]. The chemotaxis index (CI) represents the number of neutrophils and lymphocytes counted in 20 microscope fields using an immersion objective ($\times 100$).

Phagocytosis

Phagocytosis assay was carried out by following the method described by De la Fuente [19]. The number of particles ingested by 100 neutrophils is expressed as the phagocytic index (PI), while the number of ingesting neutrophils per 100 neutrophils is expressed as phagocytic efficiency (PE).

Superoxide anion level

Using human neutrophils, we evaluated superoxide anion by following the method described by Alvarado et al. [22] for mouse macrophages. The results were expressed as nanomoles per 10^6 cells.

Lymphoproliferation

A previously described method was used [21,23]. The results were expressed as [^3H]thymidine uptake [counts per minute (cpm)].

IL-2 release

The level of IL-2 was determined in supernatants of lymphocyte cultures in the presence of PHA (25 $\mu\text{g/ml}$) by following a previously described method [23]. IL-2 was measured using an ELISA kit (DIACLONE Research), with a minimum detectable dose of IL-2 <10 pg/ml. The results were expressed as picograms per milliliter.

Cytotoxicity

For target cell cytolysis measurement, an enzymatic colorimetric assay was used (Cytotox 96 TM Promega;

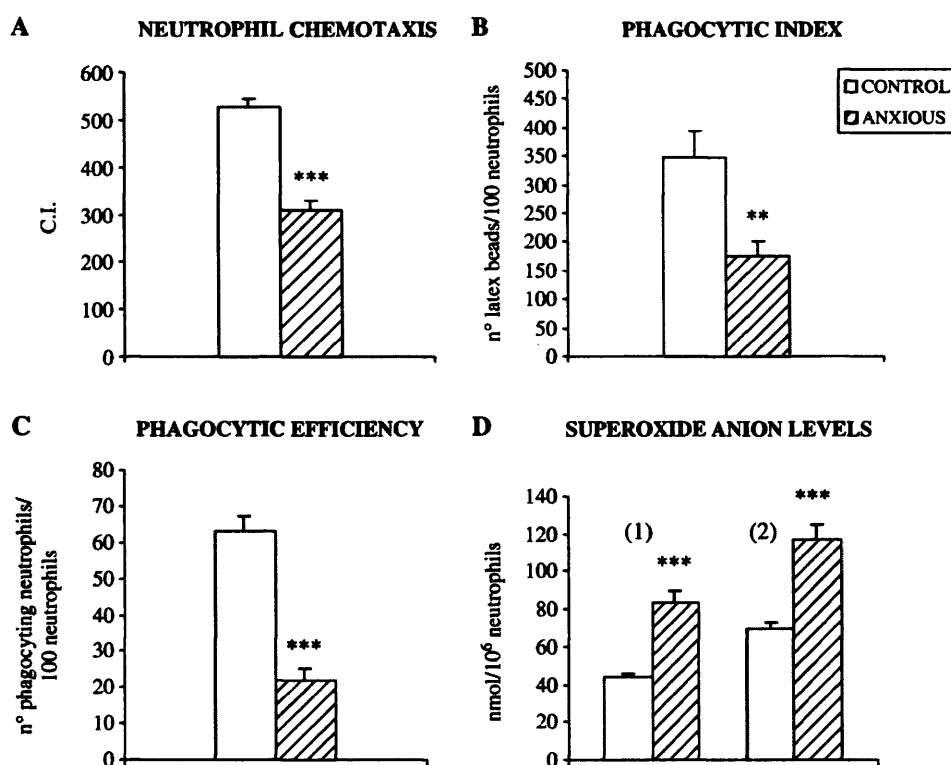


Fig. 1. CI (A), PI (number of latex beads/100 neutrophils) (B), PE (number of phagocytosing neutrophils/100 neutrophils) (C), and superoxide anion levels in nonstimulated and stimulated samples (nmol/ 10^6 cells) (D1 and D2, respectively) of human peripheral blood neutrophils from anxious and nonanxious age-matched women (controls). Each column represents the mean \pm S.E.M. of 33 subjects, with each value being the mean of duplicate assays. *** $P < .001$, ** $P < .01$ with respect to the value in the control group.

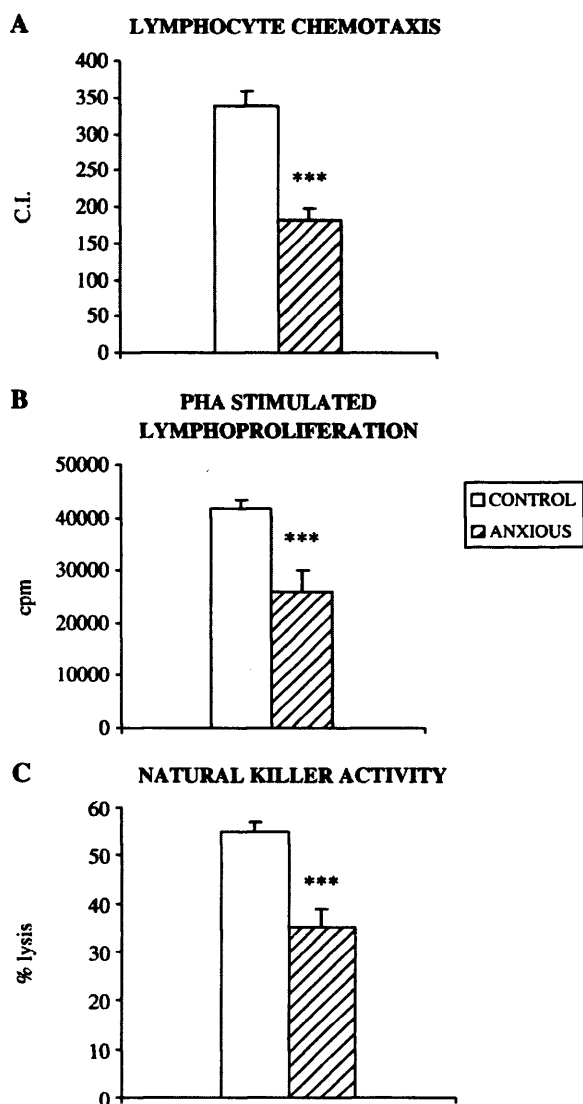


Fig. 2. CI (A), proliferation in response to PHA (cpm) (B), and NK activity (% lysis) (C) of human peripheral blood lymphocytes from anxious and nonanxious age-matched women (controls). Each column represents the mean \pm S.E.M. of 33 subjects, with each value being the mean of duplicate assays. *** $P < .001$ with respect to the value in the control group.

Boehringer Ingelheim) [24]. To determine the percentage of lysis of target cells, the following equation was used:

$$\% \text{ lysis} = \frac{E - ES - TS}{M - TS} \times 100$$

where E is the mean absorbance in the presence of effector and target cells; ES is the mean absorbance of effector cells incubated alone; TS is the mean absorbance of target cells; and M is the mean maximum absorbance after incubating target cells with a lysis solution.

Plasma cortisol

Plasma cortisol levels were determined using a competitive immunoassay colorimetric method for quantitative

determination (BIOLINK, Barcelona, Spain). Interrun and intrarun precision had a coefficient of variation of 3.2% and 5.8%, respectively. The values were expressed as nanograms per milliliter.

Plasma total antioxidant capacity

Antioxidant levels in plasma samples were evaluated with a kit provided by DELTA CLON (Madrid, Spain). Interrun and intrarun test precision had a coefficient of variation of 2.2% and 4.2%, respectively. The results were expressed as units of total antioxidant capacity (U/ml plasma). One unit of total antioxidative capacity is defined as the increase in the absorbance value of the reaction system in 0.01 min^{-1} in each milliliter of plasma at 37°C .

Statistical analysis

The data are given as mean \pm S.E.M. Since the data were normally distributed (as shown by the Kolmogorov–Smirnov test), the differences between the patient and the control group were assessed by Student's t test for unrelated samples, with $P < .05$ as the minimum significant level.

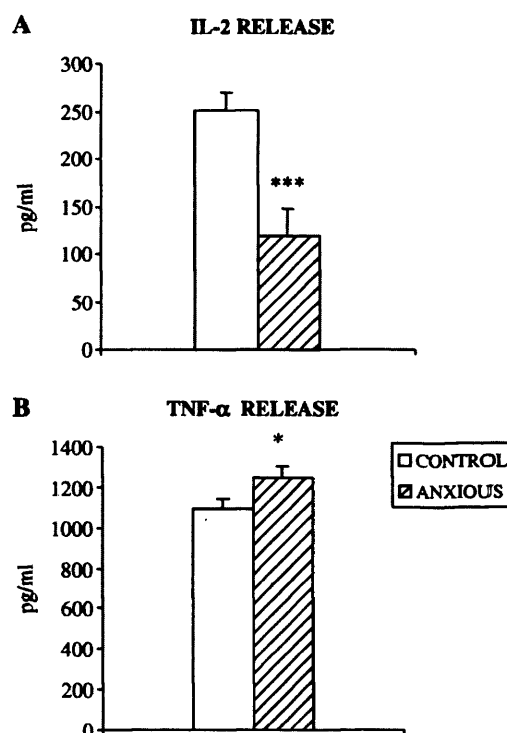


Fig. 3. IL-2 release (pg/ml) (A) in lymphocyte culture supernatants of human peripheral blood lymphocytes, and TNF- α release (pg/ml) (B) in total blood culture supernatants from anxious and nonanxious age-matched women (controls). Each column represents the mean \pm S.E.M. of 33 subjects, with each value being the mean of duplicate assays. *** $P < .001$, * $P < .05$ with respect to the value in the control group.

Results

Neutrophil functions

There were no differences in neutrophil adherence capacity between anxious and nonanxious women ($AI=50\pm4$ and 50 ± 2 , respectively). In regard to chemotaxis function (Fig. 1A), anxious subjects showed an index ($CI=307\pm24$) significantly ($P<.001$) lower than that of the control group ($CI=528\pm15$). The PI (Fig. 1B) was decreased in anxious women ($PI=174\pm27$; $P<.01$), as compared to that in their nonanxious counterparts ($PI=348\pm45$). In addition, the percentage of phagocytosing cells (Fig. 1C) was lower ($P<.001$) in anxious women ($PE=22\pm3$) than in controls ($PE=63\pm4$). Superoxide anion levels in nonstimulated and stimulated samples (Fig. 1D) were both increased in anxious women (84 ± 6 and 117 ± 8 nmol/ 10^6 cells, respectively; $P<.001$), as compared to those in the control group (44 ± 2 and 70 ± 3 nmol/ 10^6 cells, respectively).

Lymphocyte functions and NK activity

There were no differences in lymphocyte adherence between anxious and nonanxious women ($AI=54\pm3$ and 50 ± 3 , respectively). As regards chemotaxis function

(Fig. 2A), it was significantly lower ($P<.001$) in anxious women ($CI=182\pm16$) than in the control group ($CI=339\pm19$). The results of lymphoproliferation in response to PHA are shown in Fig. 2B. This function appeared to be diminished ($25,808\pm4358$ cpm; $P<.001$) in anxious subjects, with respect to their nonanxious counterparts ($41,799\pm1399$ cpm). As regards NK activity (Fig. 2C), women with anxiety showed also a decrease of this function ($35\pm4\%$ lysis; $P<.001$) with respect to the control group ($55\pm2\%$ lysis).

Cytokine release

IL-2 release (Fig. 3A) in lymphocyte culture supernatants was decreased ($P<.001$) in anxious women (118 ± 29 pg/ml) with respect to controls (251 ± 19 pg/ml), while TNF- α release (Fig. 3B) measured on culture supernatants of total blood in the presence of LPS appeared to be increased ($P<.05$) in anxious subjects (1248 ± 54 pg/ml) as compared to the control group (1094 ± 49 pg/ml).

Plasma measurements

Plasma cortisol (Fig. 4A) was increased ($P<.001$) in anxious women (37 ± 6 ng/ml) in comparison to controls (12 ± 1 ng/ml). As regards plasma total antioxidant capacity (Fig. 4B), anxious women (223 ± 11 U/ml) showed decreased levels ($P<.05$) compared to nonanxious subjects (260 ± 14 U/ml).

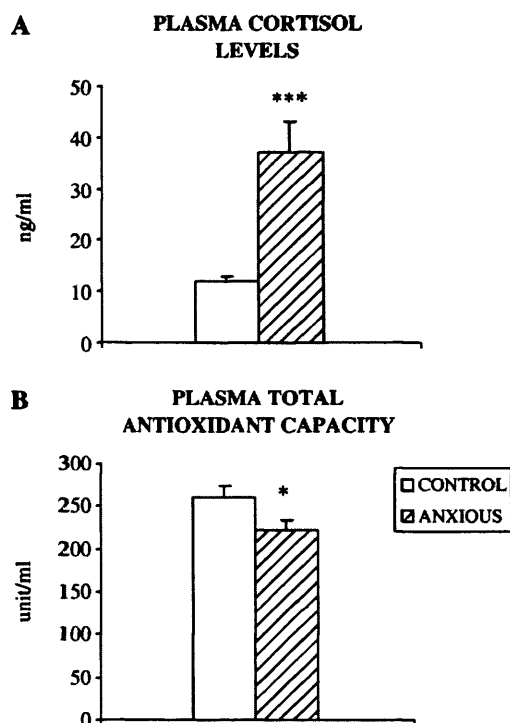


Fig. 4. Plasma cortisol levels (ng/ml) (A) and total antioxidant capacity (U/ml) (B) in anxious and nonanxious age-matched women (controls). Each column represents the mean \pm S.E.M. of 33 subjects, with each value being the mean of duplicate assays. *** $P<.001$, * $P<.05$ with respect to the value in the control group.

Discussion

Maintaining a good functioning of immune cells has been shown to be a health and longevity marker, which has been demonstrated specifically as regards chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion levels, lymphoproliferation, IL-2 release, NK activity, and TNF- α release [12–14]. However, since there are controversial data concerning immune function changes exhibited by anxious subjects, more studies are needed to understand them better. Thus, the aim of the present work was to study important lymphocyte and neutrophil functions, cytokine release, and plasma cortisol and total antioxidant capacity in anxious women versus nonanxious controls of the same age. Moreover, the immune functions analyzed have previously been studied in peritoneal leukocytes from anxious mice, which has shown an impairment of those functions with respect to nonanxious animals [12–14,22,25].

Psychological alterations can induce hormonal and biochemical changes in order to help preserve homeostasis, but sometimes leading to physiological stress. Since cortisol is the principal glucocorticoid that modulates anxiety [2], its increased secretion by the HPA axis, as reflected in augmented plasma levels, may contribute importantly to the immune function decline shown by anxious subjects. In fact,

it is well known that cortisol can change immune cell trafficking, proliferation, cytokine secretion, antibody production, and cytolytic activity [3]. In addition, increased glucocorticoid secretion has been shown to be related to high oxidative stress [26]. Besides, plasma total antioxidant capacity has previously been reported to confirm the level of oxidative stress [27], whereas it has been shown to be diminished in anxious women studied in the present work, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase in ROS. Since immune cells are particularly sensitive to the damage of their biomolecules caused by oxidative stress [28] and since their functions are specially linked to ROS generation, oxidant–antioxidant balance is essential for these cells. An imbalance between both compounds could compromise immune cell function [11], impairing immune responsiveness [29].

In fact, in this study, an increased respiratory burst, with consequent generation and release of ROS (such as superoxide anion), has been found in anxious women. Similarly, it has been described that this radical appears to be increased in mice with anxiety [12]. Although ROS production is an important mechanism of microorganism destruction by phagocytes, there is evidence of a positive correlation between low levels of superoxide anion and bactericidal activity [30]. However, Wolach et al. [31] have shown excessive superoxide generation with no parallel effect on bactericidal capacity. Nevertheless, higher levels of ROS can cause cellular injury and death [32]. Indeed, excess ROS generated by phagocytes may damage membrane lipids, resulting in altered membrane fluidity and cell-membrane-related function, including chemotaxis and phagocytosis [28,33]. Accordingly, in this study, the chemotaxis of immune cells to the focus of infection and phagocytic capacity appear to deteriorate in anxious women. These results agree with those found by us and other authors in response to anxiety in both human and mouse models, especially in female mice [12–14,25,34].

Furthermore, since cytokines are essential modulators of interactions that regulate cell-mediated and humoral immunity, changes in their content could play a crucial role in the immune function decline linked to anxiety. In this study, LPS-induced TNF- α appears to be increased in anxious women, which is in agreement with the observation of other authors in human and mouse models [8,13,22]. The proinflammatory cytokines and oxidant molecules produced during the inflammatory response, which follows infection, may be beneficial or detrimental to the subject, depending on the levels and conditions in which they are produced. Thus, excessive levels of those compounds could be deleterious, since they are related to chronic inflammatory and autoimmune diseases [35]. Furthermore, several inflammatory cytokines, including TNF- α , produced by activated monocytes and macrophages may up-regulate the production of adhesion molecules [36] via the activation of the transcriptional regulatory factor nuclear factor κ B (NF- κ B), which is also induced by

oxidative stress [29]. Our results indicate no defective adherence function in anxious emotional situations. Thus, a diminished total antioxidant capacity could reflect an increased antioxidant uptake by immune cells in order to help neutralize the increasing expression of adhesion molecules and other oxidative-stress-related events. In addition, higher TNF- α levels may contribute to impaired chemotactic function since this cytokine has been shown to induce the expression of macrophage-migration-inhibitory factor [37].

With regard to PHA-induced IL-2 release, we have found decreased levels in anxious women. Other authors have described similar results in anxiety [6]. Considering that IL-2 is an important stimulus for lymphoproliferative responses and NK activity [38], its decrease could be related to the impairment observed in these functions in the anxious women studied in the present work. In agreement with that fact, several studies have found anxiety to be strongly related to reduced PHA-induced lymphocyte proliferative and NK responses in both humans and mice [6–8,13,22,39–42]. In this respect, as mentioned above, anxiety-induced increased cortisol levels can suppress cytokine secretion, immune cell proliferation, and cytolytic activity [3]. Moreover, several reports support the concept of an inhibitory action of excess ROS on lymphoproliferation [43,44] and IL-2 production through NF- κ B induction by ROS [44].

In view of the above, it appears that high levels of anxiety lead to an evident impairment of immune response at least for several innate, cell-mediated, and NK functions, as well as for cytokine levels studied in the present work. This impairment might be related to an increased secretion of cortisol by the HPA system in anxious emotional situations, leading to oxidative stress, as reflected in diminished plasma total antioxidant capacity. This general impairment of immune responsiveness in anxious women might lead them to suffer (in the long term, if not treated) frequent infectious illnesses and other immune-system-related diseases, which points out directions for future research since an important proportion of young adults who consult their general practitioner have an anxiety disorder that is not adequately diagnosed and therapeutically addressed [45]. Nevertheless, these results need to be confirmed in a larger sample exploring also gender differences, since our study focused on women only. Another limitation of the study derives from the fact that menstrual status may affect immune function. Although participants were neither ovulating nor menstruating, future studies investigating the role of estrogen and progesterone levels in the immunity of anxious women are needed. In addition, despite the fact that all women studied in both experimental groups had at least basic school education and belonged to the middle and high classes, thus having no finance-related worries, research considering other important sociodemographic characteristics of the samples, such as family or employment status, would be of great interest.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2005-06777).

References

- [1] Rabin BS. Stress, immune function, and health: the connection. New York: Wiley-Liss and Sons, 1999.
- [2] Lundberg U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:1017–21.
- [3] Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444–8.
- [4] Koh KB. The relationship between stress and natural killer-cell activity in medical college students. *Korean J Psychosom Med* 1993;3:3–10.
- [5] Koh KB. Emotion and immunity. *J Psychosom Res* 1998;45:107–15.
- [6] Koh KB, Lee BK. Reduced lymphocyte proliferation and interleukin-2 production in anxiety disorders. *Psychosom Med* 1996;58:80.
- [7] Borella P, Bargellini A, Rovesti S, Pinelli M, Vivoli R, Solfrini V, Vivoli G. Emotional stability, anxiety, and natural killer activity under examination stress. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:613–27.
- [8] Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosmans E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpé S, Smith RS. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 1998;10:313–8.
- [9] Maes M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1995;19:11–38.
- [10] De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo MC. The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1356–66.
- [11] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313–6.
- [12] Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002;134:41–8.
- [13] Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:249–56.
- [14] Guayerbas N, De la Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339–50.
- [15] De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:55–8.
- [16] Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol* 1988;56:893–7.
- [17] Beck AT. Beck Anxiety Inventory Spanish version. San Antonio: Psychological Corporation, 1993.
- [18] Comeche MI, Díaz MI, Vallejo MA. Cuestionarios, Inventarios y Escalas, Ansiedad, Depresión y Habilidades Sociales. Madrid: Fundación Universidad-Empresa, 1995.
- [19] De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A. Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J Endocrinol* 1997;153:475–83.
- [20] Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 β , interleukin-6 and tumour necrosis factor- α production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol* 1996;71:25–30.
- [21] De la Fuente M, Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000;78:49–54.
- [22] Alvarado C, Álvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1203–10.
- [23] Carrasco M, Hernanz A, De la Fuente M. Effect of cholecystokinin and gastrin on human peripheral blood lymphocyte functions, implication of cyclic AMP and interleukin-2. *Regul Pept* 1997;70:135–42.
- [24] Ferrández MD, Correa R, Del Río M, De la Fuente M. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675–85.
- [25] Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 2001;114:80–8.
- [26] Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlström U, Rosén A. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;6:883–90.
- [27] Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005;164:775–8.
- [28] Izzüt-Uysal VN, Tan R, Bülbül M, Derin N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol Int* 2004;28:517–21.
- [29] Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327–47.
- [30] Boxer LA. Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, editors. *Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995. pp. 828–44.
- [31] Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A. Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions. *Pediatr Res* 2000;48:369–73.
- [32] Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:719–41.
- [33] Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Regulation of macrophage function by the antioxidant *N*-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int Immunopharmacol* 2003;3:97–106.
- [34] Sacerdote P, Panerai AE, Frattola L, Ferrarese C. Benzodiazepine-induced chemotaxis is impaired in monocytes from patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:243–9.
- [35] Grimble RF. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* 1998;14:634–40.
- [36] Collins T. Biology of disease: endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993;68:499–508.
- [37] Hirokawa J, Sakaue S, Furuya Y, Ishii J, Hasegawa A, Tagami S, Kawakami Y, Sakai M, Nishi S, Nishihira J. Tumour necrosis factor- α regulates the gene expression of macrophage migration inhibitory factor through tyrosine kinase-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem* 1998;123:733–9.
- [38] Solana R, Alonso MC, Peña J. Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 1999;34:435–43.
- [39] Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GW, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med* 1984;46:7–14.
- [40] Esterling BA, Antoni MH, Kumar M, Segneiderman N. Defensive-ness, trait-anxiety, and Epstein-Barr viral capsid antigen antibody titers in healthy college students. *Health Psychol* 1993;12:132–9.
- [41] Zorrilla E, Redei E, Derubeis RJ. Reduced cytokine levels and T-cell function in healthy males: relation to individual differences in subclinical anxiety. *Brain Behav Immun* 1994;8:293–312.
- [42] Leonard BE, Song C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:299–303.

- [43] Pahlavani MA, Harris MD. Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998;25:903–13.
- [44] Arai T, Yamada H, Namba T, Mori H, Ishii H, Yamashita K, Sasada M, Makino K, Fukuda K. Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1185–93.
- [45] Wittchen HU, Boyer P. Screening for anxiety disorders: sensitivity and specificity of the anxiety screening questionnaire (ASQ-15). *Br J Psychiatry* 1998;173:109–26.

ORIGINALES

Cambios con el envejecimiento en los valores de glutatión de células inmunitarias y plasma. Efecto de la administración de N-acetilcisteína

Lorena Arranz^a, Cesáreo Fernández^b, Antonio Rodríguez^b, José Manuel Ribera^b y Mónica De la Fuente^a

^aDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

^bDepartamento de Geriatria. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: en trabajos previos hemos demostrado el deterioro con la edad de una serie de funciones de las células inmunitarias descritas como marcadores de salud y longevidad, e igualmente, hemos comprobado cómo éstas mejoran tras la administración del antioxidante precursor del glutatión: N-acetilcisteína (NAC).

Pacientes y métodos: se estudió a 36 mujeres posmenopáusicas seleccionadas aleatoriamente, 18 de 50-60 años y 18 de más de 70 años. La NAC se administró en dosis diaria de 600 mg, durante 4 meses. Antes de iniciarse el tratamiento, a los 2 meses de comenzar el mismo, una vez concluido y 3 meses después de su finalización, se procedió a la extracción de sangre periférica. Como control de edad se empleó a 18 mujeres de 30-40 años, a las que se extrajo sangre una única vez. Se estudiaron los valores de glutatión total en linfocitos, neutrófilos y plasma mediante cinética enzimática por espectrofotometría.

Resultados: con el envejecimiento se produce una disminución en los valores de glutatión. El tratamiento con NAC es capaz de aumentarlos en los leucocitos, efecto que no se ve reflejado en el plasma. El aumento en las células inmunitarias se aprecia ya a los 2 meses de tratamiento, es más relevante a los 4 meses y se mantiene a los 3 meses tras su finalización.

Conclusiones: la disminución en los valores de glutatión de las células inmunitarias con la edad podría explicar el deterioro funcional que éstas experimentan. La administración de NAC podría mejorar la función inmunitaria mediante el aumento de esos valores. Por otra parte, la determinación del glutatión plasmático no es una medida adecuada para conocer los valores de este antioxidante en el organismo y, consecuentemente, de su estado de estrés oxidativo, ya que puede no relacionarse con el experimentado por los leucocitos circulantes.

Este trabajo ha sido financiado por Zambon S.A. (Zambon Group), España. Este trabajo ha recibido el premio Salgado Alba 2006 a la mejor comunicación en forma de póster del Área Biológica presentada durante el 48.º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, celebrado en Pamplona del 14 al 17 de junio de 2006.

Correspondencia: Dra. M. De la Fuente.
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
C/ José Antonio Nováis, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: mondelaf@bio.ucm.es.
Recibido el 27-12-2006; aceptado el 25-01-2007.

Palabras clave

Glutatión. N-acetilcisteína. Leucocitos. Plasma. Mujeres posmenopáusicas.

Changes with ageing in immune cell and plasma glutathione levels. Effect of N-acetylcysteine administration

ABSTRACT

Introduction: we previously demonstrated the ageing-associated decline of certain immune functions, which have been described as markers of health and longevity and confirmed that administration of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), which is a glutathione precursor, improves these functions.

Patients and methods: thirty-six randomly selected postmenopausal women, 18 aged 50-60 years old and 18 aged more than 70 years were studied. NAC administration consisted in a daily 600 mg dose for 4 months. Peripheral blood samples were collected before starting administration, after 2 months' administration, at the end of the treatment period, and 3 months later. A group of 18 women aged 30-40 years was used as a control group. Samples from controls were drawn only once. Total glutathione levels in lymphocytes, neutrophils and plasma were studied by enzymatic kinetics using a spectrophotometer assay.

Results: glutathione levels declined with ageing in both leucocytes and plasma. NAC administration increased glutathione levels in leucocytes but not in plasma. The increase in immune cell glutathione levels was observed as early as 2 months after the start of NAC administration and was greater at 4 months. This effect continued for 3 months after the end of the treatment.

Conclusions: the age-related decline of glutathione levels in immune cells could play an important role in the functional impairment of these cells during the ageing process. Additionally, NAC could exert its beneficial effects on immune function via the increase in the glutathione content present in immune cells. Determination of plasma glutathione is not an accurate indication of the body's oxidative stress condition, since plasma levels might not be related to the levels of this antioxidant in blood leucocytes.

Key words

Glutathione. N-acetylcysteine. Leucocytes. Plasma. Postmenopausal women.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la esperanza de vida media de las poblaciones de los países desarrollados ha dado lugar a un interés generalizado por conocer cuáles son los mecanismos que nos hacen envejecer y finalmente morir. En la actualidad, la teoría más aceptada que permite explicar el proceso de envejecimiento es la teoría de los radicales libres, propuesta inicialmente por Harman¹ en 1956, y posteriormente evidenciada y perfilada por numerosas aportaciones de diferentes autores^{2,3}. Según esta teoría, el envejecimiento es resultado del estrés oxidativo crónico que experimentan los organismos vivos, debido al desequilibrio entre la producción de compuestos oxidantes y la presencia o actividad de las defensas antioxidantes endógenas, a favor de los primeros. Esta oxidación progresiva conduce al daño de biomoléculas que, finalmente, es la causa del deterioro en las funciones fisiológicas que se produce con la edad, incluido el que se observa en la función inmunitaria^{4,5}. Es más, puesto que las células inmunitarias se encuentran especialmente ligadas a la génesis de especies reactivas de oxígeno para la realización de sus funciones, el equilibrio oxidantes/antioxidantes tiene una especial importancia para los leucocitos que, por otra parte, son particularmente sensibles al daño oxidativo⁶. Así, el sistema inmunitario parece ser especialmente sensible al proceso de envejecimiento; su deterioro está íntimamente relacionado con la morbilidad y la mortalidad asociadas con la edad, debido a las funciones esenciales que este sistema ejerce en el organismo. De hecho, el riesgo de tener infecciones, así como la gravedad de éstas, se encuentran aumentados en la vejez, del mismo modo que lo está la susceptibilidad al cáncer⁷. Por otra parte, la capacidad de preservar una función inmunológica adecuada ha demostrado ser un buen marcador de salud y predictor de longevidad⁸, lo que queda evidenciado en el caso de los animales que alcanzan una elevada longevidad y en los individuos centenarios, los cuales mantienen una buena función inmunitaria^{9,10}.

Dado que las células inmunitarias son una fuente importante de compuestos oxidantes y proinflamatorios, ambos deben encontrarse bajo el control exhaustivo de las defensas antioxidantes, ya que valores aumentados de estos compuestos pueden dañar no sólo a las propias células que los producen, sino también a las que forman parte de los tejidos vecinos¹¹. Por otra parte, el déficit en antioxidantes se ha asociado al declive en las respuestas inmunológicas, lo que a su vez conduce a infecciones graves y frecuentes que resultan en un aumento en la mortalidad¹¹. En este contexto es necesario tener en cuenta que, entre las defensas antioxidantes endógenas, el glutatión (GSH) es el antioxidante tiólico no enzimático más importante que presenta el organismo para prevenir del estrés oxidativo en la mayoría de células, tejidos y órganos¹². Este compuesto se requiere para eliminar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa, que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). Así, el cociente glutatión oxida-

do/glutatión reducido (GSSG/GSH) es un importante indicador del estado redox celular¹³, que se encuentra implicado en respuestas tan vitales para el sistema inmunitario como la proliferación o la apoptosis¹⁴. El GSH es, además, esencial para la célula puesto que interviene en numerosas funciones como la síntesis de proteínas y ADN, el transporte de aminoácidos al interior de la célula, el mantenimiento de los grupos tiólicos intracelulares, la reducción enzimática del dehidroascorbato y la eliminación de compuestos tóxicos¹⁵. De esta forma, se ha demostrado que la depleción, incluso moderada, de las reservas intracelulares de GSH tiene dramáticas consecuencias para una variedad de funciones linfocitarias; son especialmente sensibles las dependientes de interleucina 2¹⁶. Por otro lado, el envejecimiento va acompañado de la disminución en este contenido en GSH, lo que se ha observado en numerosas células y tejidos, incluidos algunos componentes del sistema inmunológico¹⁷.

Sobre la base de lo anteriormente comentado, la administración exógena de compuestos tiólicos podría tener efectos beneficiosos mejorando el declive en la función inmunitaria asociado a la vejez. No obstante, dado que el GSH no penetra con facilidad al interior celular, sino que es sintetizado intracelularmente, su administración directa no es un procedimiento eficaz con el objetivo de aumentar los valores de tioles intracelulares^{18,19}. De esta forma, la administración de precursores del GSH, como la N-acetilcisteína (NAC), podría resultar mucho más efectiva gracias tanto a la neutralización directa de radicales libres²⁰ como a la recuperación de las reservas de GSH²¹. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la suplementación de la dieta con NAC es capaz de mejorar la función inmunológica en ratones con envejecimiento prematuro^{22,23}, y que en humanos la administración de NAC es un método eficaz para mejorar el deterioro inmunitario que se produce en los individuos de edad avanzada²⁴⁻²⁶. El objetivo del presente trabajo fue, por una parte, conocer los cambios que experimentan con la edad los 2 tipos principales de células inmunitarias, linfocitos y fagocitos, en los valores de GSH, y comprobar si siguen el mismo perfil que en plasma, que es la muestra habitualmente empleada para verificar el estado oxidativo del organismo. Por otra parte, nos propusimos comprobar si la administración de NAC aumenta los valores de ese antioxidante en las mencionadas localizaciones.

PACIENTES Y MÉTODOS

Participantes

Todas las mujeres participantes eran españolas integrantes de la población de Madrid. Los criterios de inclusión en los grupos experimentales del ensayo fueron los que a continuación se detallan: 1) ser mujer posmenopáusica mayor de 50 o de 70 años, 2) gozar de un buen estado de salud, definido como ausencia de enfermedad o alteración analítica relevante clínicamente en alguno de los

Arranz L et al. CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN LOS VALORES DE GLUTATIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y PLASMA. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA

siguientes parámetros: glucosa, urea, creatinina, alanina y aspartato transaminasas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y recuentos de células sanguíneas (plaquetas, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos).

Los criterios de exclusión fueron: enfermedad general grave, enfermedades inmunológicas, cáncer, demencia o alteración cognitiva, enfermedad respiratoria crónica, hipertensión, diabetes, esperanza de vida inferior a 1 año, bajo nivel de colaboración y haber tomado acetilcisteína, vitaminas o antioxidantes durante los 6 meses previos al estudio.

El grupo de mujeres de 50-60 años fue obtenido del personal trabajador del Hospital Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, mientras que las mujeres de más de 70 años se obtuvieron de las usuarias del Servicio de Geriátrica del mismo hospital pertenecientes al programa «Envejecer con éxito». Se seleccionó aleatoriamente a un total de 1.000 candidatas, de las cuales 600 fueron contactadas. De ellas, 140 aceptaron participar en el estudio, pero 90 fueron retiradas por los criterios de exclusión anteriormente comentados. De las 50 mujeres restantes, se seleccionó a 19 de 50-60 años y 21 de más de 70, de forma aleatoria. De las 40 participantes que iniciaron el estudio en la primera visita, 4 se retiraron (1 de 50-60 años y 3 de más de 70) y no acudieron a la segunda visita. Posteriormente, otras 2 mujeres mayores de 70 años decidieron abandonar la investigación, una en la tercera visita y la otra en la cuarta.

Como control de edad adulta se emplea un grupo de 18 mujeres voluntarias compañeras de trabajo, familiares y conocidas del grupo investigador. Los criterios de inclusión fueron: 1) ser mujer de 30-40 años de edad, 2) gozar de una buena salud. Los criterios de exclusión fueron los mismos que los aplicados para los grupos experimentales.

Todas las participantes recibieron información detallada acerca del objetivo del estudio y dieron su consentimiento escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación científica; se respetó en todo caso su derecho a la privacidad. Las participantes potenciales dieron su consentimiento informado antes del inicio de cualquier procedimiento relativo al estudio. Las muestras de sangre periférica (tomadas por punción venosa) fueron recogidas siempre a la misma hora, en el curso de cada entrevista clínica, con objeto de controlar el efecto de las variaciones circadianas sobre el sistema inmunitario, y en tubos con citrato como anticoagulante (BD Vacutainer Systems). En los grupos experimentales, las muestras sanguíneas fueron tomadas antes de iniciarse la administración de NAC, a los 2 meses del inicio de esa administración, una vez finalizada ésta (a los 4 meses) y 3 meses después de dicha finalización. A los controles de 30-40 años se les extrajo sangre una única vez.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético acreditado de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se realizó conforme a las normas oficiales vigentes y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y los principios de la Declaración de Helsinki. Un monitor de ensayos clínicos (PHIDEA, S.L.) aseguró el desarrollo adecuado del estudio en los términos mencionados.

Antioxidante en estudio: N-acetilcisteína

La NAC es un derivado de un aminoácido natural, la cisteína, con un elevado grado de seguridad. El presente trabajo consistió en un estudio de fase IV con un principio activo de una especialidad farmacéutica autorizada. El antioxidante en estudio fue Flumil® (producido por Zambon Group, S.p.A., Italia, y suministrado por Pharmazam, S.A., España), en forma de comprimidos orales efervescentes que contienen 600 mg de NAC cada uno. La dosis diaria consistió en 600 mg de NAC disueltos en medio vaso de agua. La administración se realizó por la noche justo antes de acostarse, durante 4 meses. La correcta administración fue comprobada en las entrevistas clínicas correspondientes.

Entrevistas clínicas

Las entrevistas fueron llevadas a cabo por los médicos residentes Cesáreo Fernández y Antonio Rodríguez en una consulta del Departamento de Geriátrica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en total privacidad. Se efectuaron un total de 4 visitas a los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales. La primera visita se realizó el día 1 para la selección. La segunda visita se llevó a cabo a los 2 meses de iniciada la administración de NAC, la tercera, a los 4 meses, el último día de administración del antioxidante, y la cuarta, 7 meses después de iniciarse el estudio, 3 meses después de finalizar la administración de NAC. En cada una de ellas se realizó la extracción sanguínea.

En el curso de la primera entrevista clínica se anotaron los datos demográficos del paciente, las medicaciones concomitantes utilizadas, se realizó un examen físico completo, se evaluaron los síntomas y los parámetros funcionales, se dispensó el fármaco y se explicó al paciente cómo efectuar su correcta administración. En las siguientes entrevistas se valoraron todos los cambios a esta situación y los acontecimientos adversos. En la segunda y tercera visitas se evaluó además la medicación que habían tomado las pacientes.

Obtención de los linfocitos y los neutrófilos sanguíneos

Los linfocitos y neutrófilos periféricos se obtuvieron siguiendo una técnica previamente descrita²⁶, a través de un gradiente de sedimentación empleando Hystopaque de densidad 1,077 (Sigma, St. Louis, USA) para la sepa-

Arranz L et al. CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN LOS VALORES DE GLUTATIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y PLASMA. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA

ración de los linfocitos y de 1,119 (Sigma) para los neutrófilos. Se obtuvieron las células de ambas interfases, que a continuación fueron lavadas 2 veces en solución salina tamponada de fosfatos (PBS). Una vez centrifugadas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio Hank. Se realizó el recuento celular mediante microscopia óptica y se comprobó la pureza de la suspensión, mediante identificación de la morfología celular; ésta fue mayor o igual al 98% en todos los casos. Se ajustaron las suspensiones celulares a una concentración final de 10^6 linfocitos/ml o 10^6 neutrófilos/ml, utilizando medio Hank. Se comprobó además la viabilidad celular antes de cada ensayo mediante la prueba de exclusión del colorante azul Tripán (Sigma), y sólo se emplearon las muestras en las que ésta era mayor o igual al 99%.

Obtención del plasma

Para la obtención del plasma, se centrifugó 1 ml de sangre mezclada con citrato (0,9:0,1) durante 20 min a 1.000 g.

Medida de los valores de glutatión

Para la medida de los valores de GSH se empleó el método de Tietze²⁷, con algunas modificaciones²⁸; la monitorización de la variación en la absorbancia se realizó a 412 nm. Las alícuotas de 1 ml de suspensión de linfocitos y de neutrófilos (10^6 células/ml medio Hank) se centrifugaron a 1.200 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, los precipitados se resuspendieron en una solución de ácido tricloracético (TCA, Panreac, España) al 5% con HCl 0,01N (Panreac) y fueron sonicados en hielo y centrifugados a 3.200 g durante 5 min a 4 °C. Alícuotas de estos sobrenadantes, obtenidos de las suspensiones celulares, y de plasma se valoraron empleando en la mezcla de la reacción los siguientes componentes: 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, 6 mM) (Sigma), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, en su forma reducida (β -NADPH, 0,3 mM) (Sigma) y glutatión reductasa (GR, 10 U/ml) (Sigma). Se realizó el seguimiento de la reacción durante 240 s y los resultados se expresaron como nmol/ 10^6 células, en el caso del GSH presente en linfocitos y neutrófilos, y μ M en el caso del GSH circulante en plasma.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. La normalidad de las muestras se comprobó mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias debidas a la edad fueron estudiadas mediante la prueba de ANOVA para muestras independientes, mientras que las diferencias debidas al tratamiento, dentro de cada grupo experimental, fueron evaluadas mediante la prueba de ANOVA para muestras apareadas. Un valor de $p < 0,05$ fue el criterio de mínima diferencia estadísticamente significativa empleado en todos los casos.

RESULTADOS

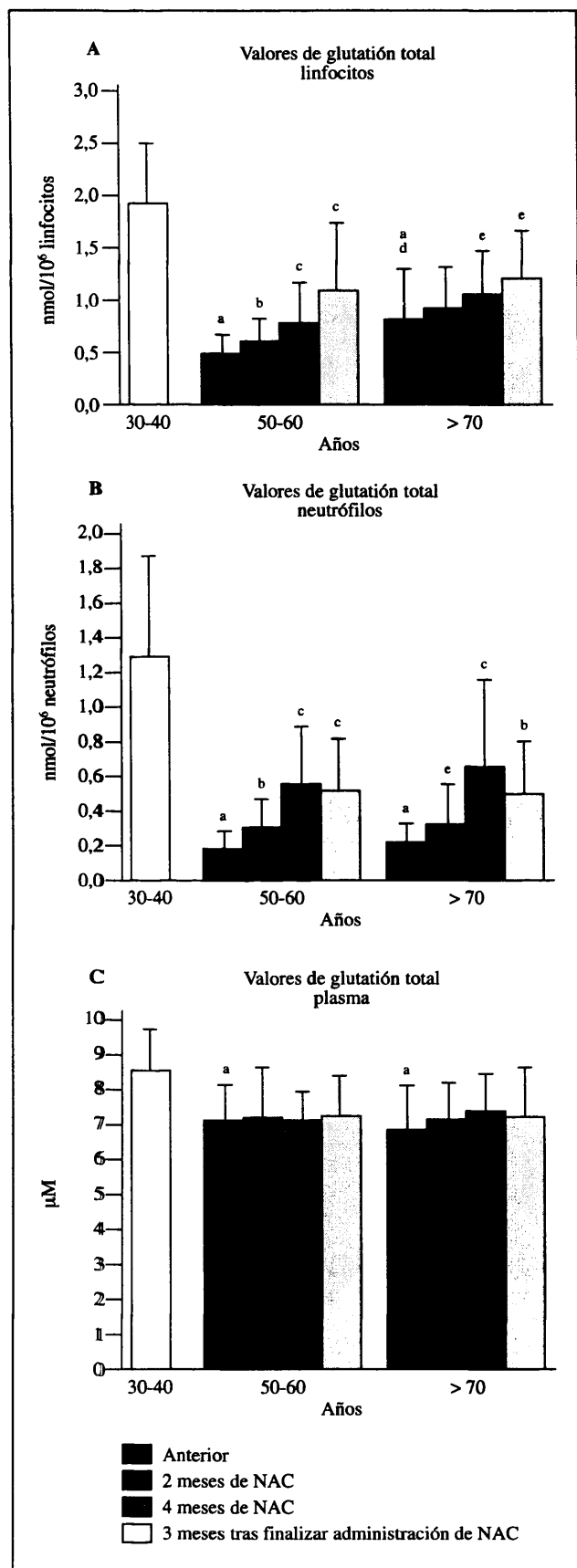
Los valores de GSH total presente en linfocitos, en neutrófilos y en el plasma (fig. 1) disminuyen significativamente ($p < 0,001$) con el envejecimiento. Esa disminución respecto a los valores obtenidos en las mujeres de 30-40 años ya se aprecia en las mujeres de 50-60 años, y se mantiene en las de más de 70. No obstante, los linfocitos de las mujeres mayores de 70 años presentan más contenido en GSH que los de las mujeres de 50-60 ($p < 0,01$; fig. 1A).

La administración de NAC produce un aumento en los valores del GSH intracelular de linfocitos y neutrófilos (fig. 1A y 1B), efecto que no se ve reflejado en el plasma (fig. 1C). El aumento del GSH en las células inmunitarias se aprecia ya a los 2 meses de tratamiento (las diferencias son estadísticamente significativas [$p < 0,01$]) en los linfocitos y en los neutrófilos de las mujeres de 50-60 años, y en los neutrófilos ($p < 0,05$) de las mayores de 70 años. Esas diferencias en el aumento de los valores de GSH se hacen más relevantes a los 4 meses del tratamiento (con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0,001$ en neutrófilos en las 2 edades estudiadas y en linfocitos de mujeres de 50-60, y de $p < 0,05$ en los linfocitos de mujeres mayores de 70 años). Transcurridos 3 meses de la finalización de la administración de NAC sigue apareciendo un aumento, estadísticamente significativo, en relación con el valor previo al inicio del tratamiento en los linfocitos y neutrófilos de mujeres de 50-60 ($p < 0,001$) y mayores de 70 años ($p < 0,05$ en linfocitos y $p < 0,01$ en neutrófilos).

DISCUSIÓN

El presente trabajo pone de manifiesto que los valores de GSH, tanto plasmáticos como los presentes en linfocitos y neutrófilos, disminuyen en mujeres mayores de 50 años en relación con los presentes en las mujeres de menor edad (30-40 años). Hay una serie de trabajos en los que se han detectado cambios en los valores de GSH con la edad. Prácticamente todos ellos se han basado en medidas en sangre total, eritrocitos, suero o plasma y, aunque se han encontrado resultados contradictorios, una mayoría detecta menores valores de GSH plasmático en los sujetos ancianos en relación con los jóvenes²⁹. En otros estudios realizados en plasma se ha observado que el declive dramático y rápido del sistema antioxidante del GSH es alrededor de la década de los 50 años³⁰. También se ha descrito una disminución con la edad en las concentraciones de GSH presentes en linfocitos; éstas se encuentran en los individuos de 60-80 años por debajo de la mitad de las detectadas en estas células de sujetos de 20-40 años³¹. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la disminución en los valores de GSH, tanto plasmático como intraleucocitario, se observa ya en las mujeres posmenopáusicas de 50 años, y se mantiene en mujeres mayores de 70 años. Estos datos re-

Arranz L et al. CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN LOS VALORES DE GLUTATIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y PLASMA. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA



velan, por tanto, un declive importante de los valores de GSH coincidente con la pérdida de la actividad estrogénica, lo que parece corroborar el hecho descrito por otros autores de que la unión de los estrógenos con sus receptores da lugar al aumento en la expresión de genes asociados con una mayor esperanza de vida, entre los que se encuentran los que codifican para ciertas enzimas antioxidantes como las implicadas en la cinética del GSH³². El hecho de que los linfocitos de las mujeres que superan los 70 años muestren unos valores mayores de GSH que las de 50 podría ser resultado del tipo de colectivos utilizados en el estudio. Así, mientras el grupo de mujeres de 50-60 años fue tomado casi exclusivamente de las trabajadoras del Hospital Clínico San Carlos, que podrían tener unos niveles de estrés, horas de sueño o hábitos alimenticios diferentes de los del resto de la población general de esa edad, las mujeres de más de 70 años fueron obtenidas de las usuarias del Servicio de Geriatria del mismo hospital, concretamente del programa «Envejecer con éxito». Esta especial condición, junto con los criterios rigurosos de selección empleados, y que obligaron a rechazar a muchas de las potenciales participantes, podría haber conducido a que este grupo de mujeres ancianas probablemente sea un colectivo que goce de un estado de salud superior al de la población general de mujeres de su misma edad. Dada esta limitación de nuestro estudio, sería muy interesante llevarlo a cabo en un futuro en una población más variada de individuos. Asimismo, con el fin de obtener una muestra lo más cercana posible a la población general, se debería incluso sacrificar ciertos criterios de exclusión a la hora de obtener el colectivo a estudiar. También, esos mayores valores de GSH en los linfocitos de las mujeres que superan los 70 años, hecho que no sucede en neutrófilos, parecen estar mostrando una homeostasis más preservada en el primer tipo de células que en el segundo. Los linfocitos podrían ser capaces de producir más cantidad de GSH o conservar mejor este antioxidante ante el mayor estrés oxidativo que se sabe aparece al avanzar la edad⁵. Es un hecho, que ya ha sido comprobado en otros modelos experimentales, que los linfocitos de determinadas localizaciones aumentan sus valores de GSH reducido ante una situación de estrés

Figura 1. Valores de glutatión en linfocitos (A: nmol/10⁶ linfocitos), neutrófilos (B: nmol/10⁶ neutrófilos) y plasma (C: μM) de mujeres de 30-40 años (controles) y de mujeres posmenopáusicas de 50-60 años y de más de 70 años antes de iniciar la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 meses, transcurridos 4 meses de dicha administración y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media ± desviación estándar de 18 valores correspondientes a 18 mujeres. La columna de las mujeres de más de 70 años a los 4 meses de NAC representa 17 valores correspondientes a 17 individuos; y la de estas mismas mujeres 3 meses después de finalizar la administración de NAC a 16 valores correspondientes a 16 sujetos.

^ap < 0,001 con respecto al valor de glutatión obtenido en las mujeres de 30-40 años. ^bp < 0,01, ^cp < 0,001, ^dp < 0,01 con respecto al valor de glutatión obtenido en las mujeres de 50-60 años y ^ep < 0,05 con respecto al valor de glutatión obtenido antes de iniciarse el tratamiento.

Arranz L et al. CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN LOS VALORES DE GLUTATIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y PLASMA. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA

oxidativo como es una endotoxemia³³. También datos previos de nuestro laboratorio han comprobado que los linfocitos mantienen mejor los valores intracelulares de GSH que los fagocitos ante ese estrés oxidativo³⁴.

El presente estudio también demuestra que la administración de NAC tiene como resultado el aumento del GSH intracelular presente en los leucocitos circulantes sin afectarse en absoluto los valores plasmáticos. Incluso administraciones durante un período relativamente corto, como puede ser 2 meses, tienen este efecto beneficioso en el sentido de aumentar los valores de GSH leucocitario. Los linfocitos de las mujeres mayores de 70 años son una excepción, al no manifestar en ese período ningún efecto, pero hay que considerar que esas células a esa edad son las que presentaban mayores valores basales. Cuando el tiempo de administración de NAC es de 4 meses, el efecto es claramente manifiesto en los 2 tipos de leucocitos y a las 2 edades analizadas. Además, ese efecto es duradero, puesto que se sigue manteniendo 3 meses después de haberse finalizado el tratamiento. Algunos autores han afirmado que los cambios en el estado redox que se producen con la edad son reversibles³⁰. De esta forma, podrían llevarse a cabo intervenciones nutricionales o terapéuticas para intentar restaurar dicho estado redox. Dado que, como anteriormente se ha indicado, el GSH no penetra fácilmente al interior celular^{18,19}, su administración directa únicamente intervendría de forma importante en el mantenimiento del estado redox del plasma. Por tanto, deben emplearse estrategias alternativas, como la provisión de aminoácidos precursores³⁵ y/o de agentes inductores de las enzimas de su síntesis³⁶. Sin embargo, el aminoácido cisteína se oxida fácilmente, es bastante inestable y algunas de sus formas presentan dificultad de absorción y transporte al interior celular³⁷. La mayor parte de las células y los tejidos sólo presenta alta actividad de transporte para la forma reducida de la cisteína, por lo que una suplementación eficaz de ésta es a través de la administración del derivado estable NAC³⁷. La NAC no sólo es un precursor efectivo de la síntesis intracelular de GSH²¹, también puede estimular la actividad de enzimas citosólicas implicadas en el ciclo del GSH, como la GSH reductasa, que aumenta la tasa de regeneración del GSH³⁸, e incluso actuar de forma directa como antioxidante mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno a través de su grupo tiol²⁰. De nuestros resultados se puede deducir que el efecto beneficioso de la NAC sobre la función inmunitaria^{22-25,34} se puede realizar de forma importante mediante el aumento de las reservas de GSH. Por otra parte, a pesar de que las reservas de GSH aumentan de forma muy significativa con la administración de NAC en mujeres de 50-60 años y en las de más de 70 años, no llegan al nivel de las más jóvenes, lo que puede estar mostrando una menor actividad y/o expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de GSH a partir de la NAC al envejecer. Dado que los efectos parecen acumulativos, ya que aumentan con el tiempo, sería interesante conocer el efecto de la administración de NAC a más largo plazo o con una dosis algo superior.

Se podría deducir de los resultados del presente estudio que la disminución en los valores de GSH de las células inmunitarias con la edad es una causa, posiblemente de las más relevantes, del deterioro funcional que experimentan dichas células y que conduce al individuo a presentar con mayor frecuencia infecciones graves, así como otras afecciones en las que el sistema inmunitario se encuentra implicado, como el cáncer, dando lugar a un aumento en la morbilidad y la mortandad a medida que avanza el proceso de envejecimiento. Asimismo, la administración de NAC se muestra como una estrategia eficaz, incluso en tratamientos cortos y a edades avanzadas, para aumentar los valores de GSH en el interior de los leucocitos, hecho que se evidencia como una de las causas principales de la marcada mejora que se observa en la función inmunitaria tras esa administración. De esta forma, la NAC podría contribuir de forma importante a mejorar la salud, y por tanto, la calidad de vida de los individuos en la vejez, potenciando la función de sus defensas inmunológicas. No obstante, no es posible, por el momento, generalizar los resultados obtenidos en el presente estudio. Hay que tener en cuenta que nuestro ensayo se centró exclusivamente en mujeres, con objeto de evitar la posible variabilidad en función del sexo. Aunque varios estudios no han mostrado diferencias entre varones y mujeres con respecto a los cambios que se producen en los valores de GSH con la edad^{19,31}, se hacen necesarios futuros estudios que incidan en las posibles diferencias por sexo, tanto de las consecuencias del proceso de envejecimiento como de la respuesta a la administración de compuestos antioxidantes como el que nos ocupa. Por otra parte, dada la dificultad que se tuvo para encontrar voluntarios que quisieran participar en el estudio y que cumplieran con rigor los criterios de selección planteados, fundamentalmente en el grupo de mujeres de más de 70 años, el número final de participantes fue bastante limitado. Futuras investigaciones con un tamaño muestral mayor serán sin duda de gran interés.

Por último, es importante destacar, como conclusión que se extrae de este trabajo, el hecho de que la determinación del GSH plasmático no es un marcador adecuado para conocer el valor de este antioxidante en el organismo, puesto que puede no relacionarse con el que está presente en otras localizaciones, como son los leucocitos circulantes, sin duda una muestra con significado biológico mucho más relevante que el plasma. Dada la generalizada utilización de plasma en las analíticas que se llevan a cabo para determinar nuestro estado de salud, habría que ser más críticos con las conclusiones que se hacen, en relación con ciertos parámetros, tomando como base únicamente los resultados obtenidos en muestras plasmáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300.

Arranz L et al. CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN LOS VALORES DE GLUTATIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y PLASMA. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEÍNA

2. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*. 1998;33:113-26.
3. Dröge W. Oxidative stress and aging. En: Roach RC, Vagner PD, Ackelt PH, et al, editors. *Hypoxia: through the lifecycle*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. p. 191-200.
4. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T-cells and aging. *Front Biosci*. 2002;7:d1056-d183.
5. De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal*. 2005;7:1356-66.
6. Izgüt-Uysal VN, Tan R, Bülbül M, Derin N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol Int*. 2004;28:517-21.
7. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis*. 2000;31:578-85.
8. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol*. 1990;114:80-8.
9. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*. 1995;16:12-6.
10. Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol*. 2005;165:33-40.
11. Knight JA. Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annu Clin Lab Sci*. 2000;30:145-57.
12. Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*. 2002;37:1333-45.
13. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:916-21.
14. Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:346-61.
15. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242:1-9.
16. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, et al. Function of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J*. 1994;8:1131-8.
17. Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci*. 2000;67:1317-24.
18. Puri RN, Mester A. Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:5228-60.
19. Lenton KJ, Tierriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1194-200.
20. Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, et al. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1994;16:9-13.
21. De Flora S, Izzati A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med*. 1991;91:122-30.
22. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of the N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature aging. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:797-804.
23. Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice. *J Appl Biomed*. 2005;3:199-205.
24. Arranz L, Rodríguez A, Fernández C, Ribera JM, De la Fuente M. Un tratamiento de 2 meses con N-acetilcisteína mejora la función leucocitaria en mujeres mayores de 50 años. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2005;40:9-62.
25. Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. Efecto de un tratamiento de 2 meses con N-acetilcisteína sobre la función de neutrófilos en mujeres mayores de 50 años. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2005;40:63-118.
26. De la Fuente M, Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*. 2000;78:49-54.
27. Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem*. 1969;27:502-22.
28. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Álvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol*. 2004;50:683-90.
29. Yang CS, Chou ST, Liu L, Tsai PJ, Kuo JS. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1995;674:23-30.
30. Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg PJr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1290-300.
31. Van Lieshout EMM, Peters WHM. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1998;19:1873-5.
32. Viña J, Borrás C, Gambini J, Satre J, Pallardó FV. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *FEBS Lett*. 2005;23:2541-5.
33. Victor VM, Guayerbas N, De la Fuente M. Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem*. 2002;229:107-111.
34. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic Biol Med*. 2003;37:919-29.
35. Anderson ME, Luo JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis*. 1998;18:415-24.
36. Dhakshinamoorthy S, Long DJ 2nd, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul*. 2000;36:201-16.
37. Dröge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B*. 2005;360:2355-72.
38. Banadocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses*. 2001;56:472-7.

Influence of Aging and Enriched Environment on Motor Activity and Emotional Responses in Mice

CLAUSTRO ZAMBRANA, EVA M. MARCO, LORENA ARRANZ,
NURIA M. DE CASTRO, MARIA PAZ VIVEROS
AND MÓNICA DE LA FUENTE

*Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

ABSTRACT: We have evaluated different behavioral parameters in ICR (CD1) female mice of three different ages (38–39 weeks: mature; 62 weeks: late mature; 90 weeks: old), and addressed the effects of an enriched housing condition. We employed the following battery of tests: Holeboard, open field, elevated plus-maze (EPM), and forced swimming test (FST). The results suggest that aging process differentially affects diverse aspects of behavior. With respect to motor activity, late mature animals were more affected by enrichment, whereas old animals appeared to be more affected when emotional responses were considered. We propose that the diminished percentage of time in the open arms of the EPM showed by enriched mice may be indicative of decreased novelty seeking, whereas their decreased climbing behavior may indicate a reduced escape-related behavior in an inescapable situation.

KEYWORDS: mice; aging; enriched environment; motor activity; emotional responses

INTRODUCTION

Research on the effects of environmental enrichment in experimental animals has mainly focused on cognitive functions. Recently, there is an increased interest about the influence on emotional responses, and the scenario appears to be complex.^{1–3} To the best of our knowledge, there are not comparative studies about consequences of environmental enrichment on emotional behavior at different advanced ages. We aimed to evaluate possible differential effects of housing conditions in mature, late mature, and old animals.

Address for correspondence: Mónica De la Fuente, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C/ Jose Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain. Voice: 34-91-3944935; fax: 34-91-3944935.
mondela@bio.ucm.es

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1100: 543–552 (2007). © 2007 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1395.060

EXPERIMENTAL METHODS

Animals and Experimental Conditions

A total of 56 female outbred ICR-CD1 (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) were used in the present experiments. The animals were initially housed in groups of seven individuals per cage and maintained at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in a reverse 12:12 h dark–light cycle (lights on at 20.00 h), with free access to food (A04 diet from Panlab L.S Barcelona, Spain) and water.

Mice of three different ages were used: 32 weeks old ($n = 28$), 55 weeks old ($n = 14$), and 83 weeks old ($n = 14$), at the beginning of the experiment. Mice were randomly distributed in two groups: control group and environmental enriched group. Half of the animals from each age were assigned to each environmental condition. Enrichment consisted on cages with two different objects changed every 2 days at 08.00 h. The rodent toys used were: orange bucket, jolly ball, hoop, holed ball, yellow tunnel, rough red object (Lillico, Panlab), yellow billard ball and a silver ball (El Corte Inglés, Madrid, Spain). A red kennel, which was cleaned once a week, was always present in the cage.

Six weeks after the beginning of the control/enriched housing, mice were submitted to behavioral testing. At the beginning of behavioral testing animals were classified as mature mice: 38–39 weeks old; late mature mice: 62 weeks old; old mice: 90 weeks old. Throughout this testing, the animals were marked for their individual follow-up. All behavioral experimental procedures were carried out between 09.00 and 14.30 h.

The experiments performed in this study are in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) as well as with Spanish laws about protection of animals.

Behavioral Testing

As described in previous work,^{4,5} the testing sequence was as follows: holeboard, open field, elevated plus-maze (EPM), and forced swimming test (FST) or Porsolt test. We allowed an interval of 3 days between consecutive tests, for recovery of the animals from the previous testing conditions. All the tests with the exception on open field (illuminated with white light) were performed under red light.

Holeboard Test

The holeboard was a box ($60 \times 60 \times 45$ cm) bearing four equally spaced holes (3.8 cm in diameter) and divided into 36 squares (10×10 cm). The duration of the test was 5 min. External ambulation (number of line crossings

in the periphery, by the walls), frequency of rearing (number of times that the animal stood on its rear limbs) and frequency and duration of head-dipping were assessed.^{4,5}

Open-Field Test

The open-field arena consisted of a cylinder (75 cm diameter \times 50 cm high) with a floor divided into 19 sections of a similar area by two concentric circles (17 cm and 45 cm diameter) and a series of radia. The duration of the test was 3 min. The parameters measured were: external ambulation (number of squares adjacent to the wall entered with the four limbs), internal ambulation (number of squares in the central area entered with at least three limbs), and frequency of rearing.^{4,5}

EPM Test

The EPM consisted of two open arms (50 \times 10 cm) and two enclosed arms of the same size with 40-cm high walls arranged so that the arms of the same type were opposite to each other. The junction of the four arms formed a central square area (10 \times 10 cm). The test was carried out for 5 min. The measures recorded were frequency and duration (s) of arm visits, separately for open and closed arms. An arm was considered to be entered when the animal entered it with the four limbs. We also calculated the percentages of entries and time in the open arms (with respect to the total number of entries and time in arms, respectively).^{4,5} The percentages of time and entries in the open arms of the maze are the two parameters related to anxiety, whereas the number of closed arms entries provides the best measure of motor activity.⁶

Porsolt Test (FST)

The FST was performed 2 consecutive days, according to the original model with some modifications.^{5,7,8} Mice were placed individually in a cylindrical methacrylate tank (30 cm in diameter, 50 cm heights) containing tap water at $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ to a depth of 30 cm. On day 1, the animals were placed in water to swim trial of 15 min. Twenty-four h later, animals were again placed in the water for a second swim trial of 5 min. Behaviors scored included latency, floating (immobility), swimming, and climbing. Latency was defined as the time to reach first complete immobility; floating (immobility) was considered when mice floated without struggling and making only those movements necessary to keep their heads above the water. Swimming was scored as the animal making active swimming motions more than necessary to keep its head above the water

and involved moving horizontally or crossing the swim tank. Climbing behavior consisted on the animal making active upward movements with forepaws in and out of the water. These behaviors were scored in a mutually exclusive fashion throughout the trial. Immobility time may be indicative of depressive-like behavior.^{5,7,8}

Statistical Analysis

Data were analyzed by ANOVA. The Tukey method was used for *post hoc* comparisons.

RESULTS

Holeboard Test

We found significant overall effects of age on external ambulation ($P < 0.05$) and rearing ($P < 0.001$). Old mice showed lower horizontal activity than mature animals and lower rearing frequency than mature and late mature animals. Separate analyses of the three groups of age groups indicated that the effects of enrichment were significant for late mature animals ($P < 0.05$) and consisted of an increment in vertical activity (FIG. 1).

Open-Field Test

Overall effects of age were found for external ambulation ($P < 0.05$) and rearing ($P < 0.001$). Old animals showed decreased external ambulation when compared to mature mice and diminished vertical activity with respect to both, mature and late mature animals (FIG. 2).

Plus-Maze Test

The effect of age was significant for the number of closed-arm entries ($P < 0.05$) with old animals showing a significant lower value than mature mice. There was also a general increase of this parameter in enriched animals ($P < 0.01$), though additional separated analyses per age group indicated that enrichment was significant for late mature mice.

All enriched animals showed a decreased percentage of time in open arms ($P < 0.01$). Further analyses per age group revealed that the effect of enrichment was significant in old animals (FIG. 3)

Porsolt Test (FST)

As expected, in day 2 immobility time was increased, latency to first floating reduced and swimming and climbing behaviors decreased ($P \leq 0.01$). On day 1 a significant overall effect of age was found for latency to first floating ($P < 0.05$) and in time spent swimming ($P < 0.001$). Latency time was reduced in old mice when compared to late mature, whereas swimming behavior was higher in late mature mice relative to mature and old mice. Climbing behavior was affected by the enriched condition both days of testing. On day 1 ($P < 0.05$) this effect was more marked for enriched old mice (FIGS. 4 and 5).

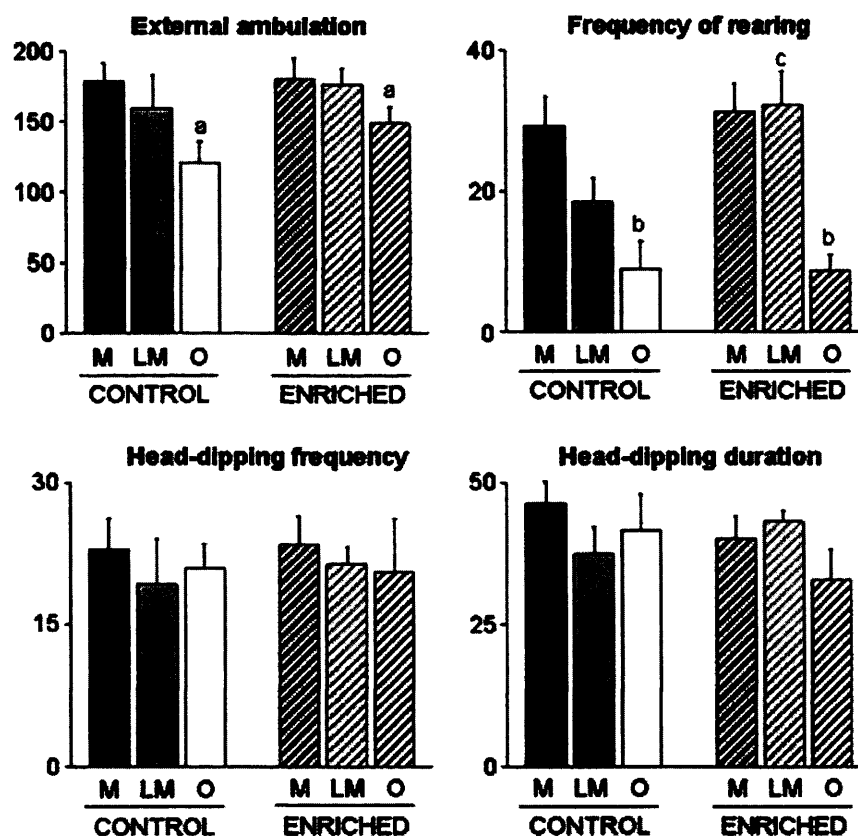


FIGURE 1. Holeboard activity in female mice of different ages: M (mature mice); LM (late mature mice); and O (old mice). Histograms represent the mean \pm SEM from the following number of animals: CONTROL: M (14); LM (7); O (6) and ENRICHED: M (12); LM (6); O (6). Significant differences set at $P < 0.05$. (a) old versus adult mice; (b) old versus mature and old mature mice; and (c) control late mature versus enriched late mature mice.

DISCUSSION

In general, old animals housed in standard conditions showed a decreased motor activity when compared to the other two control age groups: decreased motor activity in holeboard, open field, and EPM and reduced latency to first floating in the FST. A cerebellar dysfunction is likely to underlie the marked reduction in vertical activity.⁹

The holeboard provides independent measures of general motor activity (external ambulation and rearing) and directed exploration (head dipping),⁶ which are frequently dissociated with different types of treatments. Our results support this notion and indicate that the effects of age and condition were only evident in those parameters related to general motor activity.

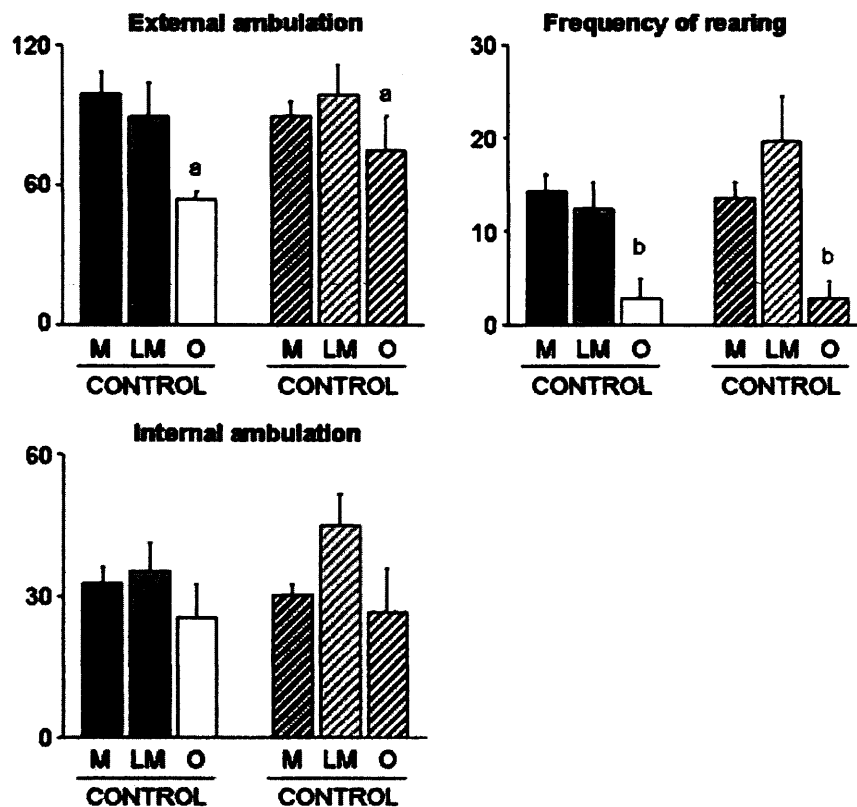


FIGURE 2. Open-field activity in female mice of different ages: M (mature mice); LM (late mature mice); and O (old mice). Histograms represent the mean \pm SEM from the following number of animals: CONTROL: M (13); LM (7); O (6) and ENRICHED: M (12); LM (6); O (6). Significant differences set at $P < 0.05$. (a) old versus mature mice; and (b) old versus mature and late mature mice.

Late mature animals appeared to be more sensible to enrichment, in relation to motor activity (effects in holeboard and EPM), whereas, old animals appeared to be more affected when emotional responses were considered (EPM and in the FST).

According to the classical interpretation of the EPM, a decreased percentage of time in the open arms is indicative of increased anxiety. From this point of view, our data are in disagreement with several studies reporting that enriched environment decrease anxiety¹⁰ but in accord with other authors that have found increased anxiety-related behavior in enriched mice in this test.³ The

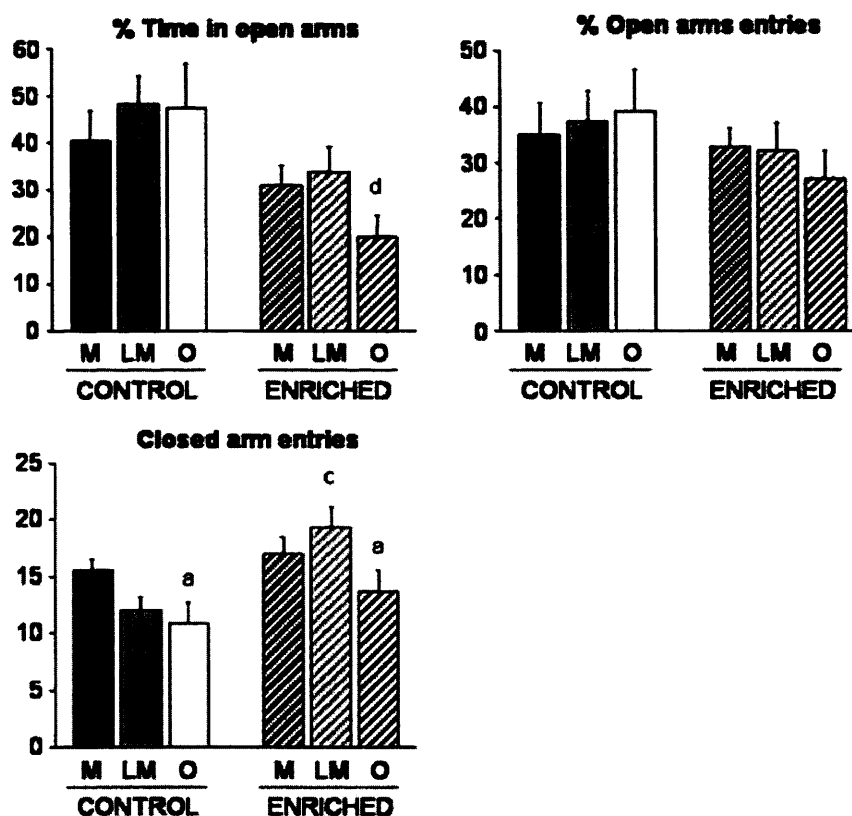


FIGURE 3. Plus-maze activity in female mice of different ages: M (mature mice); LM (late mature mice); and O (old mice). Histograms represent the mean \pm SEM from the following number of animals: CONTROL: M (11); LM (7); O (5) and ENRICHED: M (11); LM (6); O (6). Significant differences set at $P < 0.05$. (a) old versus mature mice; (c) control late mature versus enriched late mature mice; and (d) control old versus enriched old mice.

differences might be attributable to methodological aspects. In addition, the decreased percentage of time and entries in the open arms might reflect a decreased novelty seeking in the enriched mice, as a result of the abundant sensory stimulation in their housing conditions. The possible interpretation of the EPM from this perspective deserves further investigation.¹¹

In the FST, which is an inescapable situation, climbing behavior was reduced in the enriched animals. This reduced escape-related behavior might be considered adaptive, because it results in diminished energy expenditure. The fact that the reduced escape responses appeared the first day of testing could be indicative of a rapid learning ability to cope with this stressful situation.

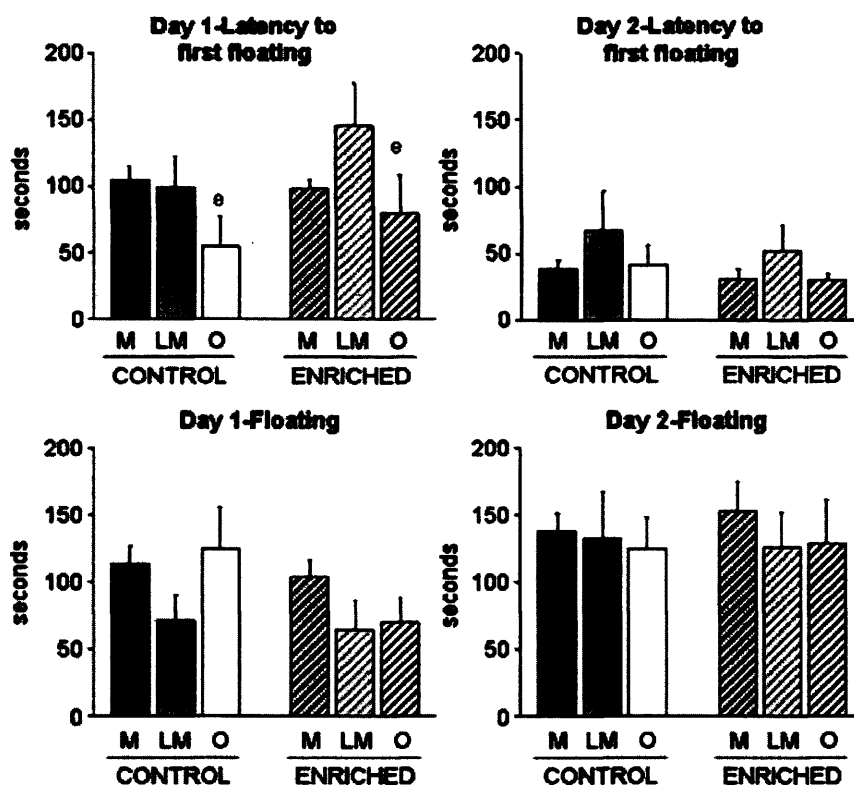


FIGURE 4. (A) Porsolt test (latency to first floating and time spent in floating behavior) in female mice of different ages: M (mature mice); LM (late mature mice); and O (old mice). Histograms represent the mean \pm SEM from the following number of animals: CONTROL: M (13); LM (7); O (5) and ENRICHED: M (12); LM (6); O (6). Significant differences set at $P < 0.05$. (e) old versus late mature mice.

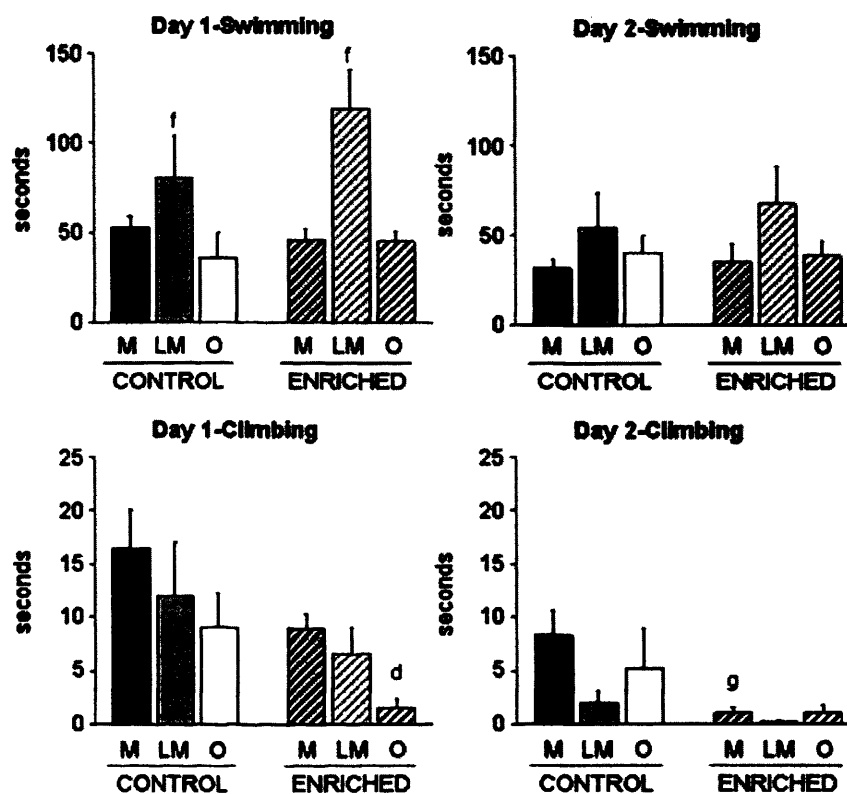


FIGURE 5. Porsolt test (time spent swimming or climbing) in female mice of different ages: M (mature mice); LM (late mature mice); and O (old mice). Histograms represent the mean \pm SEM from the following number of animals: CONTROL: M (13); LM (7); O (5) and ENRICHED: M (12); LM (6); O (6). Significant differences set at $P < 0.05$. (d) control old versus enriched old mice (f) late mature versus mature and old mice; and (g) control mature versus enriched mature mice.

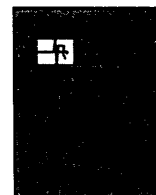
ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant of the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2005-06777).

REFERENCES

1. NITHIANANTHARAJAH, J. & A.J. HANNAN. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 697-709.

2. LEWEJOHANN, L., C. REINHARD, A. SCHREWE, *et al.* 2006. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav.* **5**: 64–72.
3. ZHU, S.W., B.K. YEE, M. NYFFELER, *et al.* 2006. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav. Brain Res.* **169**: 10–20.
4. VIVEROS, M.P., B. FERNÁNDEZ, N. GUAYERBAS, *et al.* 2001. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J. Neuroimmunol.* **114**: 80–88.
5. PEREZ-ALVAREZ, L., I. BAEZA, L. ARRANZ, *et al.* 2005. Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 965–976.
6. FILE, S.E. 1992. Behavioral detection of anxiolytic action. In *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. J.M. Elliot, D.J. Heal, C.A. Marsden, Eds.: 25–44. Wiley. New York.
7. PORSOLT, R.D., A. BERTIN & M. JALFRE. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **229**: 327–336.
8. PORSOLT, R.D. 2000. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev. Neurosci.* **11**: 53–58.
9. FORSTER, M.J., A. DUBEY, K.M. DAWSON, *et al.* 1996. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4765–4769.
10. FOX, C., Z. MERALI & C. HARRISON. 2006. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav. Brain Res.* **175**: 1–8.
11. THORSELL, A., C.J. SLAWECKI, A. EL KHOURY, *et al.* 2006. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **83**: 28–34.



Original Contribution

The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women

Irene Arranz^a, Cesáreo Fernández^b, Antonio Rodríguez^b, José Manuel Ribera^b, Mónica De la Fuente^{a,*}^a Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biological Sciences, Madrid Complutense University, Spain
^b Department of Geriatrics, San Carlos Clinical Hospital, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:
Received 20 June 2008
Received in revised form 15 July 2008
Accepted 17 July 2008
Available online 27 July 2008

Keywords:
N-acetylcysteine
Immune function
Leukocytes
Glutathione
Postmenopausal women

Aging is a chronic oxidation process in which the immune system is involved. Because leukocyte function is a good health marker and longevity predictor, the effects of daily oral administration of N-acetylcysteine (NAC, 600 mg) on several lymphocyte (adherence, chemotaxis, proliferation, natural killer activity) and neutrophil (adherence, chemotaxis, phagocytosis, superoxide) functions, as well as cytokine levels (interleukin-2, tumor necrosis factor α , interleukin-8), were studied in 36 healthy postmenopausal women: 18 aged 50–69 years and 18 aged >69 years. In addition, plasma and leukocyte oxidative stress markers (glutathione, superoxide, malondialdehyde) were evaluated. These parameters were analyzed within 2 and 4 months of NAC intake and 3 months after the end of the supplementation. In parallel, samples from 18 healthy adult women aged 30–49 years were used as a control age group. The results showed general impairment of immune function and increased oxidation markers in postmenopausal women as compared with the control group; however, NAC administration significantly improved the parameters studied, bringing their values closer to those of younger women and thus exerting a modulatory, rather than a merely stimulatory, action on the immune system. These effects were also observed 3 months after the end of supplementation. The present findings suggest that a short period of NAC supply (i.e., 2–4 months) at the dose used may lead to prolonged strengthening of immune defenses in postmenopausal women, likely by increasing the leukocyte glutathione pool. Thus, NAC could contribute to maintenance of good health and quality of life in postmenopausal women by decreasing the probability of immune system-related diseases, such as infections, in aging.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

The process of aging is the result of chronic oxidative stress which affects living organisms, owing to the imbalance between endogenous oxidant and oxidant compounds. This progressive oxidation leads to damage of biomolecules, which ultimately causes the age-related decline in physiological functions, including immune function [1,2]. Furthermore, as immune cell function is particularly linked to generation of reactive oxygen species, this oxidant–antioxidant balance is essential for immune cells, which are, in addition, highly sensitive to damage to their biomolecules caused by oxidative stress [3]. For these reasons, the immune system is especially sensitive to the aging process, and moreover, its impairment exerts a great influence on age-related

morbidity and mortality [2]. Thus, the risk and severity of infections, as well as susceptibility to cancer, are increased with advanced age, evidencing the overall decline in host immunity in the elderly [4]. In addition, the capacity to maintain adequate immune function has been shown to be a good health marker and a predictor of increased longevity [5,6]. This has been demonstrated specifically with regard to immune cell chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion levels, lymphoproliferation, natural killer (NK) activity, and release of interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) [6–10]. In this respect, it has been reported that leukocyte function is preserved in centenarians, which may be related to the ability of these individuals to reach their very advanced age in healthy condition [11]. Furthermore, given that immune cells are an important source of oxidant and proinflammatory compounds, contents of both must be tightly controlled by the antioxidant defenses, as increased levels of those compounds may damage not only immune cells, but also the surrounding cells and tissues [2,12].

Moreover, an antioxidant deficit has been related to impaired immune responses, leading to frequent and severe infections that result in increased mortality [12]. In relation to antioxidant defenses, glutathione (GSH) is the principal intracellular nonprotein thiol and plays a major role in preservation of the intracellular redox state. The key biological function of GSH is to act as a nonenzymatic reducing agent,

Abbreviations: AI, Adherence Index; BHT, butylated hydroxytoluene; CI, Chemotaxis Index; DTNB, 5,5'-diithiobis(2-nitrobenzoic acid); GSH, total glutathione; HPLC, high performance liquid chromatography; IL, interleukin; LDH, lactate dehydrogenase; LPS, polysaccharide; MDA, malondialdehyde; NAC, N-acetylcysteine; B-NADPH, B-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; NBT, nitroblue tetrazolium; NF- κ B, nuclear factor κ B; NK, natural killer; PI, Phagocytic Index; PHA, phytohemagglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species; TBA, 2-thiobarbituric acid; TCA, trichloroacetic acid; TNF, tumor necrosis factor.

Corresponding author. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. Fax: +34 91 394 49 35.
E-mail address: mondelaf@bio.ucm.es (M. De la Fuente).

preventing oxidative stress in most cells, tissues, and organs [13]. With aging, there is a decrease in this GSH content, which has been observed in a variety of cells and tissues, including those of the immune system [14,15]. This progressive decrease in the ability to remove free radicals along with the aging process induces oxidation of the cell components including lipids, which leads to the disruption of membrane organization [16]. In addition, lipid peroxides degrade into reactive aldehyde products, such as malondialdehyde (MDA), which can covalently bind to proteins and alter their function and, therefore, the functions of the cell [17].

In view of the preceding, exogenous administration of thiolic compounds, such as *N*-acetylcysteine (NAC), could have favorable effects, improving the age-related impairment of immune function, acting not only as GSH precursor and thus replenishing its levels [18], but also neutralizing free radicals in a direct manner [19]. Moreover, diet supplementation with NAC improves immune function in biologically aged mice [20,21]. Likewise, in the present work, the effect of NAC administration (600 mg/day) for 2 and 4 months on some key lymphocyte and neutrophil functions, and cytokine levels, which show age-related changes [2,22,23], has been studied in postmenopausal women. In addition, for the aforementioned reasons, GSH and MDA levels were also measured.

Materials and methods

Participants

All subjects studied in the present work were Spanish and recruited from the population of Madrid. The inclusion criteria were postmenopausal status, age >49 and >69 years, and healthy condition, which was defined as the absence of pathology or findings of clinical significance in the following general laboratory parameters: glucose, urea, creatinine, alanine and aspartate transaminases, bilirubin, alkaline phosphatase, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume and hemoglobin, and blood cell counts (platelets, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils). Exclusion criteria were severe general pathology, immune diseases, cancer, dementia or cognitive alteration, chronic respiratory disease, hypertension, diabetes, life expectancy less than 1 year, poor collaboration level, and intake of acetylcysteine, vitamins, antioxidants, or any drug influencing the immune system (including estrogens and progestagens) during the previous 6 months.

Women older than 49 (50–69 years) were recruited from workers of San Carlos Clinical Hospital and Complutense University of Madrid, whereas participants older than 69 were users of the geriatric service of the same hospital and belonged to the “Successful Aging” Program. A total of 1000 potential participants were randomly selected, from which 600 were contacted and asked to participate in the study. Of these, 140 subjects accepted and met the inclusion criteria, but 90 were excluded based on the aforementioned exclusion criteria. A sample size of about 20 individuals per experimental group was calculated according to standard deviations from the means of parameters in groups under study, error of $\alpha=0.05$, power of 80%, and risk of retirement of 10%, which was considered greater in the women >69 than in those aged 50–69. Finally, 19 women aged 50–69 and 21 women >69 were randomly selected. The study began with 40 participants who attended the first clinical interview; however, 4 (1 woman 50–69 and 3 women >69) refused to continue and did not come to the second clinical interview. Afterward, 2 women older than 69 decided to leave the project: one in the third clinical interview and the other in the fourth. Thus, 18 women aged 50–69 years and 16–18 women >69 years were studied.

An adult control group of 18 volunteers were evaluated. These participants were relatives, friends, or colleagues of the research group. The subjects were all women. The inclusion criteria were age

30–49 and healthy condition. Exclusion criteria were the same as the experimental groups.

All participants received information about the purpose of study and gave their written consent for use of their blood sample for scientific research. Informed consent was sought from potential participants before beginning any specific procedure relative to study. Interviews were conducted in a private room of the Department of Geriatrics of San Carlos Clinical Hospital by the resident physicians Cesáreo Fernández and Antonio Rodríguez. Blood samples (peripheral blood drawn by venipuncture) were always collected the same time (to control for the effect of circadian variation immune parameters) and during the course of each clinical interview in tubes containing citrate (BD Vacutainer Systems, Spain). Blood samples of subjects from experimental groups were taken before beginning NAC administration, 2 and 4 months thereafter, and months after the end of treatment. Samples from adult controls were drawn once only, and spread across the study period.

This study was approved by the ethical committee of clinical research of San Carlos Hospital of Madrid and was in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki, the World Medical Association, and the official current regulations. A clinical trial number (Phidea, S.L.) ensured adequate progression of the study under the mentioned terms.

The antioxidant investigated: *N*-Acetylcysteine

NAC derives from a biological amino acid, acetylcysteine, and it has a high degree of safety. In the research described here, a phase study was developed using an active principle of an authorized pharmaceutical product. This product was Flumil (manufactured by Zambon Group, Sp.A., Italy, and provided by Pharmazam, S.A., Spain) for oral use in effervescent tablets each containing 600 mg of Flumil is available without prescription at pharmacies in Spain and is commonly used as a mucolytic. The daily dose was 600 mg dissolved in half a glass of water administered at night shortly before going to bed for 4 months. Correct administration was checked at each clinical interview.

Clinical interviews

A total of four interviews were performed with subjects in experimental groups. The first interview was done on Day 1 for final selection of participants, whereas subsequent interviews were carried out to check the progress of the study, including correct intake of NAC. The second visit was done 2 months after beginning intake, the third was carried out 4 months afterward (last day of treatment), and the fourth interview was done 3 months after the end of treatment (7 months after beginning of the study). Blood samples were drawn during each clinical interview.

Demographic data, as well as data on other drugs used, were collected during the first clinical interview. In addition, in that first interview, participants underwent a complete physical, symptom and functional examination. The participants were then given antioxidant and explained its correct intake. Changes in the situation of the participants and any adverse events were evaluated in subsequent interviews. General laboratory parameters—glucose, urea, creatinine, alanine and aspartate transaminases, bilirubin, alkaline phosphatase, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume and hemoglobin, and blood cell counts (platelets, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils)—did not show any changes of clinical relevance confirming the safety of Flumil. Only two adverse events likely related to treatment were reported: constipation in a woman in the group 50- to 69-year-olds and back pruritus in a woman in the group >69 years. The latter woman decided to leave the study and was included in the final analysis. Both complaints resolved with

plications. Conversely, most of the participants (95% of the ple) reported, throughout the project, a feeling of general improvement and fewer infections as compared with their situation ore treatment.

herence capacity

For measurement of adherence capacity, the method described by la Fuente et al. [24] was used. This method mimics, in vitro, cellular herence to endothelium in vivo. Briefly, 500 μ l of blood diluted 1:1 th Hank's medium were placed in a Pasteur pipet in which 50 mg of lon fibers were packed to a height of 1.25 cm. After 10 min, the uent had drained by gravity. The Adherence Index (AI) for utrophils and lymphocytes was calculated according to the equa- n $AI = [(cells/ml_{initial} - cells/ml_{effluent}) / (cells/ml_{initial})] \times 100$.

mor necrosis factor- α and interleukin-8 levels

TNF- α and IL-8 levels were measured in culture supernatants of al blood in the presence of lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 5:B5, Sigma, St. Louis, MO, USA), following a method previously scribed [25]. Briefly, 500 μ l of blood were diluted 1:1 with RPMI- medium without L-glutamine (Gibco, Burlington, ON, Canada) d incubated with 10 μ l gentamicin (1 mg/ml, Gibco) and 10 μ l LPS 50 ng/ml) for 4 h. Samples were centrifuged, and supernatants were llected and frozen at -20°C until assay. TNF- α and IL-8 levels were asured using an ELISA kit (Diacclone Research, Besançon, France), th minimum detectable doses of TNF- α and IL-8 under 10 and pg/ml, respectively. The results were expressed as picograms per lilititer.

lation of human blood neutrophils and lymphocytes

Peripheral blood neutrophils and lymphocytes were obtained llowing a method previously described [26], by gradient sedimenta- n using 1.119 density Hystopaque (Sigma) for neutrophil separation d 1.077 density Hystopaque (Sigma) for lymphocytes. Cells from th interfaces were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) lution. Pelleted cells were resuspended and diluted to a final con- ntration of 10^6 or 5×10^5 neutrophils/ml and 10^6 lymphocytes/ml edium. Cell viability was checked with the trypan blue (Sigma) clusion test before and after each assay, and was equal to or higher an 99% in all cases.

emotaxis

Chemotaxis was evaluated according to the technique described by la Fuente et al. [24], using chambers with two compartments parated by a polycarbonate filter (3- μ m pore diameter, Millipore rica, Madrid, Spain). Aliquots of 300 μ l neutrophil and lymphocyte 0^6 cells/ml Hank's medium) suspensions were deposited in the per chamber compartment. Aliquots of 400 μ l formyl-Met-Leu-Phe $^{-8}$ M, Sigma), used as chemoattractant agent, were placed in the er compartment. Chambers were incubated for 3 h at 37°C in a midified atmosphere of 5% CO_2 . Then, filters were fixed and stained, d the Chemotaxis Index (CI), which represents the number of utrophils and lymphocytes counted in 20 microscope fields of the er face of the filter, was determined using an immersion objective $00\times$).

agocytosis

Phagocytosis of inert particles (latex beads, 1.09- μ m diameter, ma) was assayed according to the method described by De la ente et al. [24]. Aliquots of 200 μ l neutrophil suspension (5×10^5 lls/ml Hank's medium) were incubated on MIF plates (Karter,

Noviglio, Italy) for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . The adhered monolayer obtained was washed with prewarmed PBS, and then 200 μ l Hank's solution and 20 μ l latex beads (1%) were added. After 30 min of incubation under the same conditions, plates were washed, fixed, and stained, and the number of particles ingested by 100 neutrophils, the Phagocytic Index (PI), was determined by counting in an optical microscope ($100\times$).

Superoxide anion levels

Superoxide anion, the first free radical generated in the respiratory burst, was evaluated assessing the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) in neutrophils. This was carried out following the method described by De la Fuente et al. [27] slightly modified as follows. Aliquots of 250 μ l neutrophil suspension (10^6 cells/ml Hank's medium) were mixed with 250 μ l NBT (1 mg/ml in Hank's solution, Sigma), and 50 μ l of Hank's medium and 50 μ l of the latex bead suspension (1%) were added to nonstimulated and stimulated samples, respectively. After 60 min incubation, the reaction was stopped, samples were centrifuged, supernatants were discarded, and intracellular reduced NBT was extracted with dioxan. Eventually, supernatant absorbance was measured at 525 nm with endpoint spectrophotometric assay. The levels of superoxide measured are the result of anion generation and neutralization by antioxidant defenses present in the cells. The results were expressed as nanomoles per 10^6 cells using a pattern curve.

Lymphoproliferation

A previously described method was used [26,27]. Aliquots of 200 μ l lymphocyte suspension (10^6 cells/ml complete medium containing RPMI-1640 [Gibco] supplemented with 1% gentamicin [1 mg/ml, Gibco] and 10% fetal calf serum [PAA], previously heat-inactivated for 30 min at 56°C) were dispensed in 96-well plates (Orange Scientific, Belgium), and 20 μ l/well phytohemagglutinin (PHA, Flow Labora- tories) at 25 μ g/ml was added. After 48 h incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 , 2.5 μ Ci [^3H]thymidine (ICN) were added to each well, followed by another 24 h incubation. Cells were harvested in a semiautomatic microharvester, and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. The results were expressed as [^3H]thymidine uptake (counts per minute).

Interleukin-2 levels

IL-2 levels were determined in supernatants of lymphocyte cul- tures in the presence of PHA, following a method previously described by us [28]. After 48 h of incubation with PHA (25 μ g/ml), supernatants were collected and frozen at -20°C until assay. IL-2 was measured using an ELISA kit (Diacclone Research), with a minimum detectable dose of IL-2 less than 10 pg/ml. The results were expressed as pico- grams per milliliter.

Cytotoxicity

For measurement of target cell cytolysis, we used an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96, Promega, Boehringer Ingelheim) that is based on lactate dehydrogenase (LDH) determination using tetrazolium salts [27]. Human tumoral K562 cells were used as the target in the NK assay. Cells were maintained in complete medium. Target cells were seeded in 96-well U-bottom culture plates (Orange Scientific) at 10^4 cells/well in RPMI-1640 without phenol red (Gibco). Effector cells, that is, mononuclear leukocytes, were added at 10^5 cells/ well. The effector/target ratio was 10/1. Plates were centrifuged at 250g for 5 min to facilitate cell contact and incubated afterward for 4 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Then, they were centrifuged again, and LDH enzymatic activity was measured in 50 μ l/

well supernatant by adding enzyme substrate and recording absorbance at 490 nm. Three kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release, a target maximum release, and an effector spontaneous release. To determine the percentage of lysis of target cells, we used the equation $\% \text{ lysis} = [(E - ES - TS)/(M - TS)] \times 100$, where E is the mean of absorbance values in the presence of effector and target cells; ES is the mean of absorbance values of effector cells incubated alone; TS is the mean of absorbance values in target cells; and M is the mean of maximum absorbance values after incubation of target cells with lysis solution.

Plasma preparation

Plasma samples were prepared from 1 ml of blood with citrate (0.9:0.1) by centrifugation at 1000g for 20 min.

Total glutathione levels

Total GSH was assayed by the method of Tietze [29], with some modifications [30], by monitoring the change in absorbance at 412 nm. Briefly, 1-ml aliquots of neutrophil and lymphocyte suspensions (10^6 cells/ml Hank's medium) were centrifuged at 1200g for 10 min at 4 °C. Pelleted cells were resuspended in medium containing 5% trichloroacetic acid (TCA, Panreac, Spain) in 0.01 N HCl (Panreac). Then, samples were sonicated and centrifuged at 3200g for 5 min at 4 °C. Aliquots of the supernatants of immune cells and plasma samples were measured using the following reaction mixture: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 6 mM, Sigma), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (β -NADPH, 0.3 mM, Sigma), and glutathione reductase (10 U/ml, Sigma). The reaction was monitored for 240 s, and the results were expressed as nanomoles per 10^6 cells or micromolar.

Malondialdehyde levels

Lipid peroxidation damage was assessed as the formation of MDA. MDA levels were quantified by HPLC as previously described by Chirico et al. [31], with some modifications. For MDA determination, plasma samples were mixed with the reagents H_3PO_4 (0.44 M, Fluka), 2-thiobarbituric acid (TBA, 42 mM, Sigma), and butylated hydroxytoluene (BHT, 3 mM, Sigma), and incubated at 95 °C for 30 min. The reaction was stopped with ice, and *n*-butanol (Panreac) was added to extract the organic phase. Afterward, supernatants were injected into the HPLC column (Novapack C18, 15 cm \times 3.0 mm, Waters). The eluate from the HPLC was monitored at 532 nm in a Waters 486 ultraviolet detector. Standard curves were constructed daily using MDA-bis (dimethyl acetal) solution (Sigma). The results were expressed as micromolar.

Statistical analysis

The results were expressed as means \pm SE. Normality of the samples was checked with the Kolmogorov–Smirnov test, and homogeneity of variances, with the Levene test. Differences resulting from age were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), whereas differences resulting from treatment, in each experimental group, were evaluated with Student's *t* test for related samples. The Sidak test with a level of significance set at $P < 0.05$ was used for post hoc comparisons.

Results

Leukocyte function

The data on neutrophil and lymphocyte function in 30- to 49-year old women and in postmenopausal women older than 49, before and

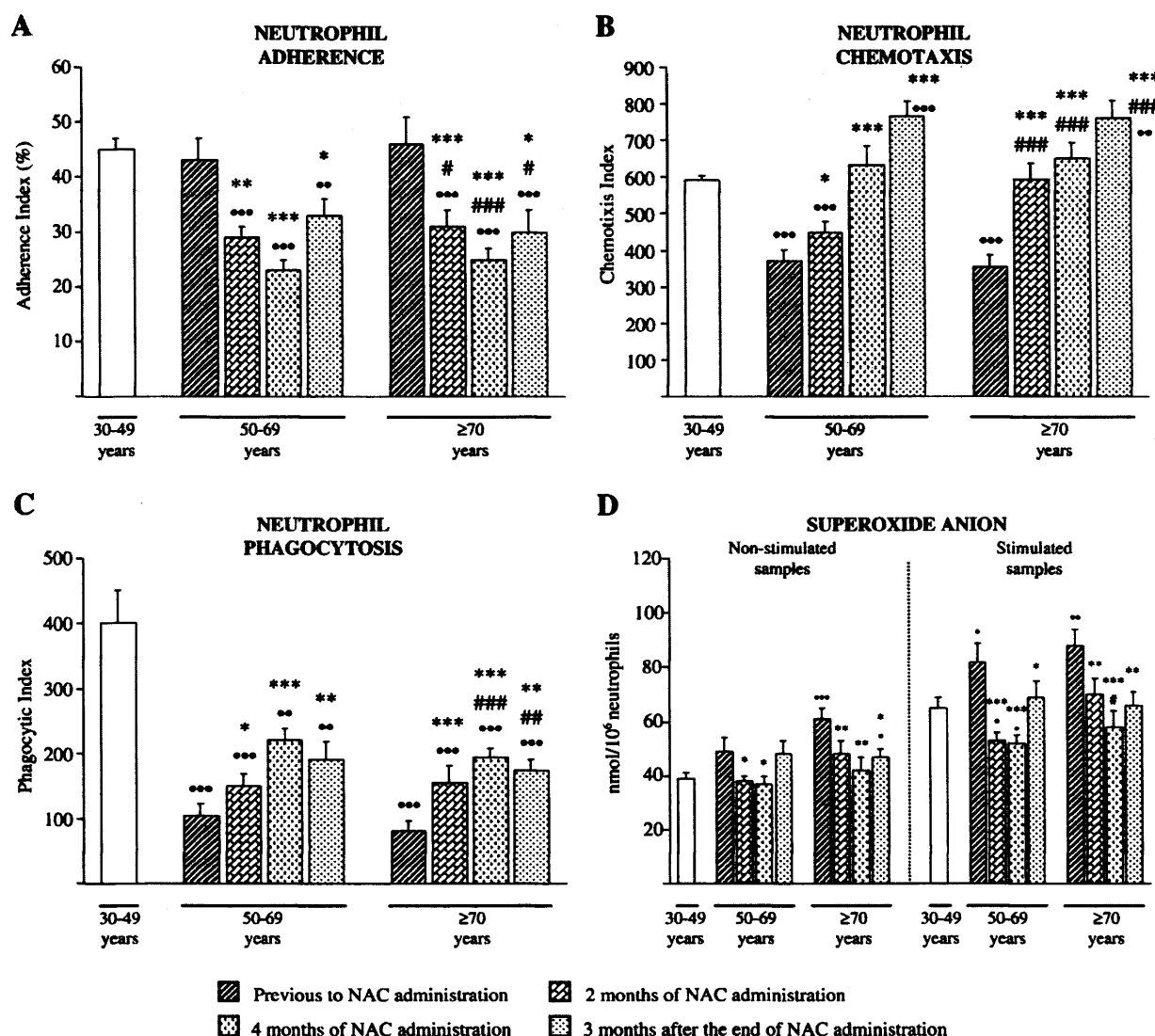
after NAC administration, are illustrated in Figs. 1 and 2. Aging the general effect of decreasing the chemotactic capacity of neutrophils and lymphocytes, the phagocytic function of neutrophils and proliferation in response to mitogens as well as the natural killing activity of mononuclear leukocytes ($P < 0.001$). Aging increased superoxide anion levels of neutrophils at rest ($P < 0.001$) as well under stimulation ($P < 0.005$). These changes were observed in the 69-year-old women and remained similar in those older than in the latter, superoxide anion level of neutrophils, especially under basal conditions (Fig. 1D), and PHA-stimulated lymphoproliferation (Fig. 2C) changes, were particularly significant.

Neutrophil and lymphocyte adherence capacity did not change with age, whereas it was decreased by NAC administration (Figs. 1 and 2A). This was observed after 2 months of NAC treatment in women in their fifties ($P < 0.01$ for neutrophils, $P < 0.05$ for lymphocytes) and women in their seventies ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively), and was more relevant at 4 months ($P < 0.001$). The effect adherence remained 3 months after the end of treatment for neutrophils ($P < 0.05$) and lymphocytes ($P < 0.05$ in women > 69 years). Throughout treatment, neutrophil adherence was lower in postmenopausal women than in the younger control group (Fig. 1A), while lymphocyte adherence in postmenopausal women reached significantly lower values only after 4 months of NAC treatment (Fig. 2).

This diminished adherence with NAC supplementation was in agreement with the progressive increase in chemotaxis (Figs. 1B and 2B), which was detectable after 2 months of NAC administration in 50- to 69-year-old women ($P < 0.05$ for neutrophils, $P < 0.001$ for lymphocytes) and in those older than 69 ($P < 0.001$), but was not relevant after 4 months of treatment ($P < 0.001$). The effect persisted months after the end of supplementation in lymphocytes ($P < 0.001$ in 50- to 69-year-olds and $P < 0.05$ in those > 69) and was even more evident ($P < 0.001$) in neutrophils. Leukocyte chemotaxis of postmenopausal women reached values similar to those of adult controls after 2 months (neutrophil chemotaxis in women > 69 and lymphocyte chemotaxis in 50- to 69-year-olds) or 4 months (neutrophil chemotaxis in 50- to 69-year-olds) of oral administration of NAC. The chemotactic capacity of leukocytes from postmenopausal women was significantly higher than that of leukocytes from the controls, after 4 months of treatment for lymphocytes ($P < 0.001$ in 50- to 69-year-olds, $P < 0.05$ in those > 69) and 3 months after the end of supplementation for neutrophils ($P < 0.05$ in 50- to 69-year-olds, $P < 0.01$ in women > 69). Moreover, lymphocyte chemotaxis remained at the level of controls 3 months after the end of treatment.

In addition, the phagocytic capacity of neutrophils was improved by NAC administration (Fig. 1C), being increased after 2 months of treatment in both groups of postmenopausal women ($P < 0.05$ in 50- to 69-year-olds, $P < 0.001$ in women > 69), and even more relevant at 4 months ($P < 0.001$). This effect remained 3 months after the end of treatment ($P < 0.01$). Intake of the antioxidant brought phagocytic function to values closer to those of the younger control group.

With respect to intracellular superoxide anion levels under basal conditions (Fig. 1D), there was a significant decrease after 2 months of NAC administration, which remained 4 months thereafter. The decrease was more significant in the women older than 69 ($P < 0.05$) than in the 50- to 69-year-olds ($P < 0.05$); the elderly (> 69) were those with the higher levels before treatment ($P < 0.001$). The beneficial effect remained in this group 3 months after the end of treatment ($P < 0.05$). Basal superoxide anion levels in postmenopausal women decreased to values similar to those of the younger controls after NAC supplementation. In addition, stimulated superoxide anion levels decreased after 2 months of NAC administration in groups of postmenopausal women ($P < 0.001$ in 50- to 69-year-olds, $P < 0.01$ in women > 69), and these changes were more relevant at 4 months of treatment ($P < 0.001$). This effect remained in both groups 3 months after the end of treatment ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). NAC treatment brought the stimulated superoxide levels to values



1. Adherence Index (percentage of neutrophil adherence to nylon fibers) (A), Chemotaxis Index (number of neutrophils) (B), Phagocytic Index (number of latex beads/100 trophils) (C), and superoxide anion levels in nonstimulated and stimulated samples (nmol/10⁶ neutrophils) (D) of human peripheral neutrophils from 30- to 49-year-old women (controls), and postmenopausal women of 50-69 years and older than 69 before NAC administration, after 2 and 4 months of NAC administration, and 3 months after the end of treatment. Each column represents the mean ± SE of 16-18 values corresponding to that number of subjects, each value being the mean of duplicate assays. ****P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.05 with respect to the value before NAC administration. ****P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.05 with respect to the value for 30- to 49-year-old women. ****P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.05 with respect to the value for 50- to 69-year-old women.

ilar to those of the control group (in the case of women >69) or even er (*P* < 0.05, in the 50- to 69-year-olds).

Lymphoproliferative capacity in response to PHA improved in a gressive fashion with NAC supplementation (Fig. 2C). This function owed a significant increase after 2 months of treatment in both ups of postmenopausal women (*P* < 0.05 in the 50- to 69-year-olds, 0.01 in women >69), and was more relevant after 4 months of ministration (*P* < 0.001) and 3 months after the end of treatment (<0.001). NAC brought the lymphoproliferation values of the 50- to -year-old women progressively closer to those of the adult men (*P* < 0.001 before treatment, *P* < 0.01 3 months after the end treatment), whereas after 2 months of NAC the women >69 reached ues similar to those of the 50- to 69-year-olds, and maintained se levels throughout the whole study.

Finally, NK activity (Fig. 2D) increased after 2 months of treatment both groups of postmenopausal women studied (*P* < 0.01 in 50- to -year-old women, *P* < 0.001 in women older than 69), and was more evant after 4 months of treatment (*P* < 0.001). This effect remained 3 nth after the end of treatment (*P* < 0.01 and *P* < 0.001, respectively).

NAC brought the NK function of postmenopausal women to values closer to those of the younger controls (*P* < 0.001 before treatment in 50- to 69-year-olds, *P* < 0.05 after 4 months of treatment).

Cytokines

Aging had the general effect of decreasing the levels of IL-2 in the supernatants of lymphocyte cultures stimulated with PHA (*P* < 0.001), which was more noteworthy in women older than 69 (*P* < 0.001 as compared with the control group) (Fig. 3A). In addition, aging had no significant effect on TNF-α (Fig. 3B) and IL-8 (Fig. 3C) levels measured in the supernatants of total blood cultures stimulated with LPS. However, a trend for TNF-α levels to increase with age was observed, and was significant in women older than 69 (*P* < 0.05 as compared with the control group).

NAC raised the levels of IL-2 (Fig. 3A) statistically significantly after 2 months of treatment (*P* < 0.05 in 50- to 69-year-old women, *P* < 0.01 in women >69), being more relevant after 4 months (*P* < 0.01 and *P* < 0.001, respectively). This effect remained 3 months after the end of

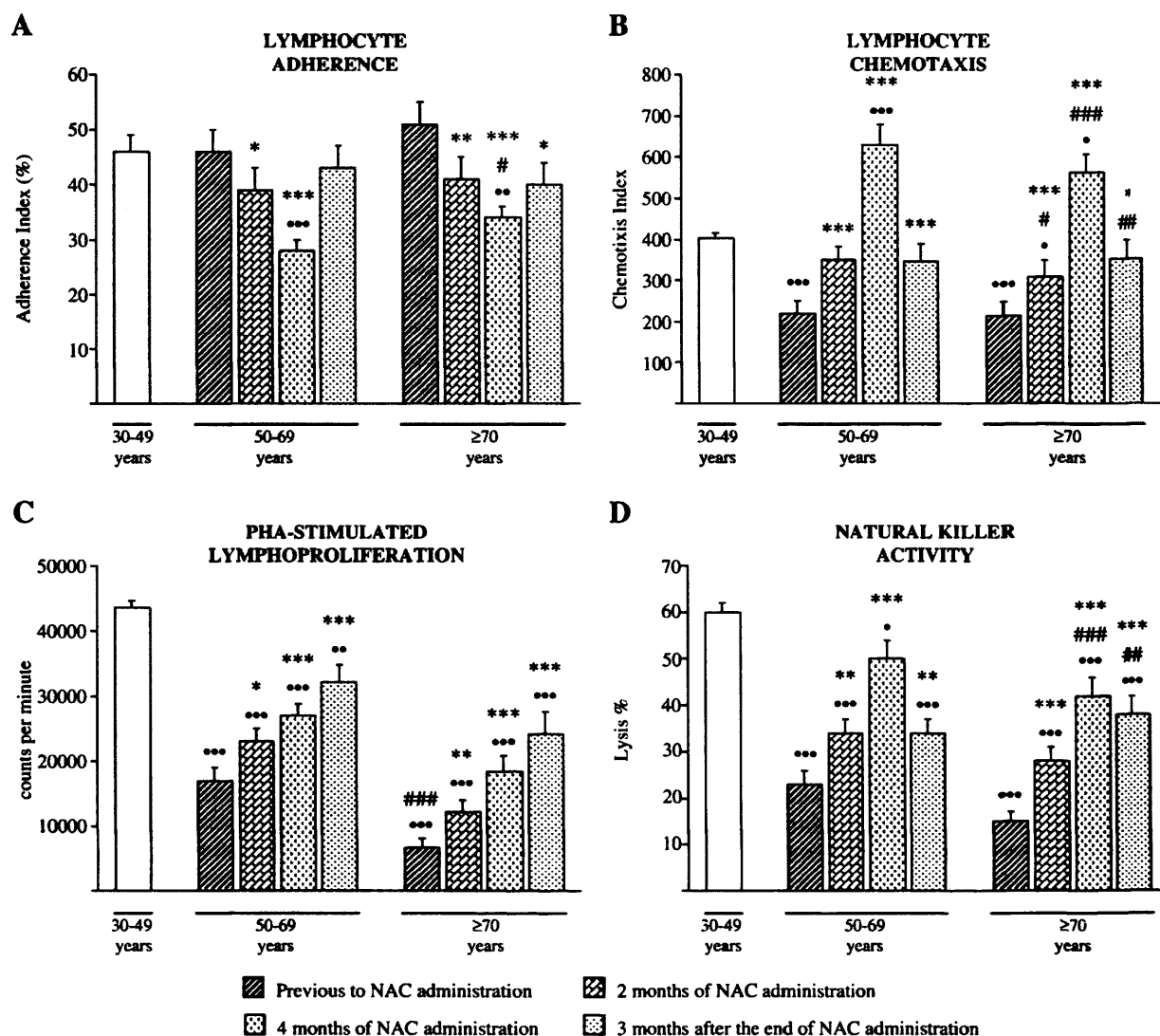


Fig. 2. Adherence Index (percentage of lymphocyte adherence to nylon fibers) (A), Chemotaxis Index (number of lymphocytes) (B), proliferation in response to PHA (counts/minute) (C), NK activity (percentage of lysis of human tumoral cells) (D) of human peripheral lymphocytes from 30- to 49-year-old women (controls), and postmenopausal women of 50–69 years older than 69 before NAC administration, after 2 and 4 months of NAC administration, and 3 months after the end of treatment. Each column represents the mean \pm SE of 16–18 v corresponding to that number of subjects, each value being the mean of duplicate assays. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ with respect to the value before NAC administration. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ with respect to the value for 30- to 49-year-old women. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ with respect to the value for 50- to 69-year-old women.

treatment in the women older than 69 ($P < 0.01$), who had values similar to those of the control group after NAC treatment throughout the whole study.

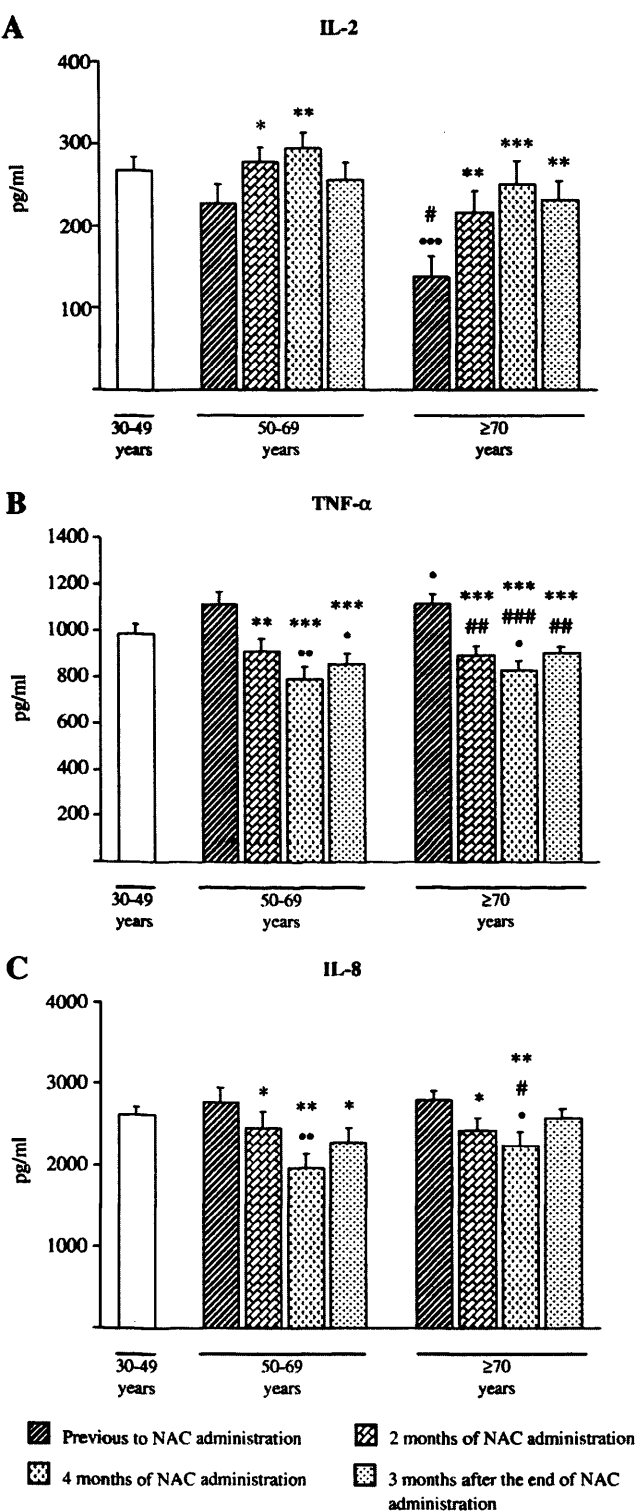
TNF- α (Fig. 3B) decreased after 2 months of NAC treatment ($P < 0.01$ in 50- to 69-year-old women, $P < 0.001$ in women > 69). This effect persisted after 4 months of administration and 3 months after its end ($P < 0.001$). NAC brought TNF- α levels in women older than 69 to values similar to, or even lower than ($P < 0.05$ with 4 months of supplementation), those of the 30- to 49-year-old women. In 50- to 69-year-old women, TNF- α also reached levels lower than those of the 30- to 49-year-olds, after 4 months of treatment ($P < 0.001$) and 3 months after its end ($P < 0.05$).

In addition, NAC reduced the levels of IL-8 (Fig. 3C) after 2 months of administration ($P < 0.05$), which was more relevant after 4 months ($P < 0.01$). The effect remained 3 months after the end of treatment in the 50- to 69-year-old women ($P < 0.05$). These women had levels of IL-8 lower than those of the 30- to 49-year-olds after 4 months of NAC treatment ($P < 0.01$), whereas the women older than 69, at that point of the study, had levels lower than those of all younger women ($P < 0.05$).

Oxidative stress

The results on neutrophil superoxide levels were described a (Fig. 1D).

Additionally, aging had the general effect of decreasing intracellular GSH content of lymphocytes and neutrophils as well the circulating plasma levels of this antioxidant ($P < 0.001$) (Fig. 4). These changes were observed in the 50- to 69-year-old women persisted in those older than 69. Nevertheless, lymphocytes of women older than 69 had a higher GSH content compared with lymphocytes of 50- to 69-year-old women ($P < 0.01$) (Figs. 4A, B). In addition, lymphocytes had higher levels of GSH than neutrophils in the control group ($P < 0.01$), and these differences increased from aging onward ($P < 0.001$). NAC supplementation increased the intracellular content of GSH in both types of leukocytes (Figs. 4A, B), which did occur in plasma (Fig. 4C). The increase in the GSH levels of immune cells was detectable after 2 months of treatment ($P < 0.01$ in lymphocytes and neutrophils of 50- to 69-year-old women, $P < 0.001$ in neutrophils of women > 69), being more relevant at 4 months ($P < 0.001$ in neutrophils of both groups of postmenopausal women).



3. IL-2 levels (pg/ml) (A) in supernatants of PHA-stimulated cultures from peripheral lymphocytes, and TNF- α (pg/ml) (B) and IL-8 (pg/ml) (C) levels in supernatants of total peripheral blood LPS-stimulated cultures, from 30- to 49-year-old women (controls), and postmenopausal women of 50–69 years and older than 69 before NAC administration, after 2 and 4 months of NAC administration, and 3 months after the end of treatment. Each column represents the mean \pm SE of 16–18 values corresponding to that number of subjects, each value being the mean of duplicate assays. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value before NAC administration. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value for 30- to 49-year-old women. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value for 50- to 69-year-old women.

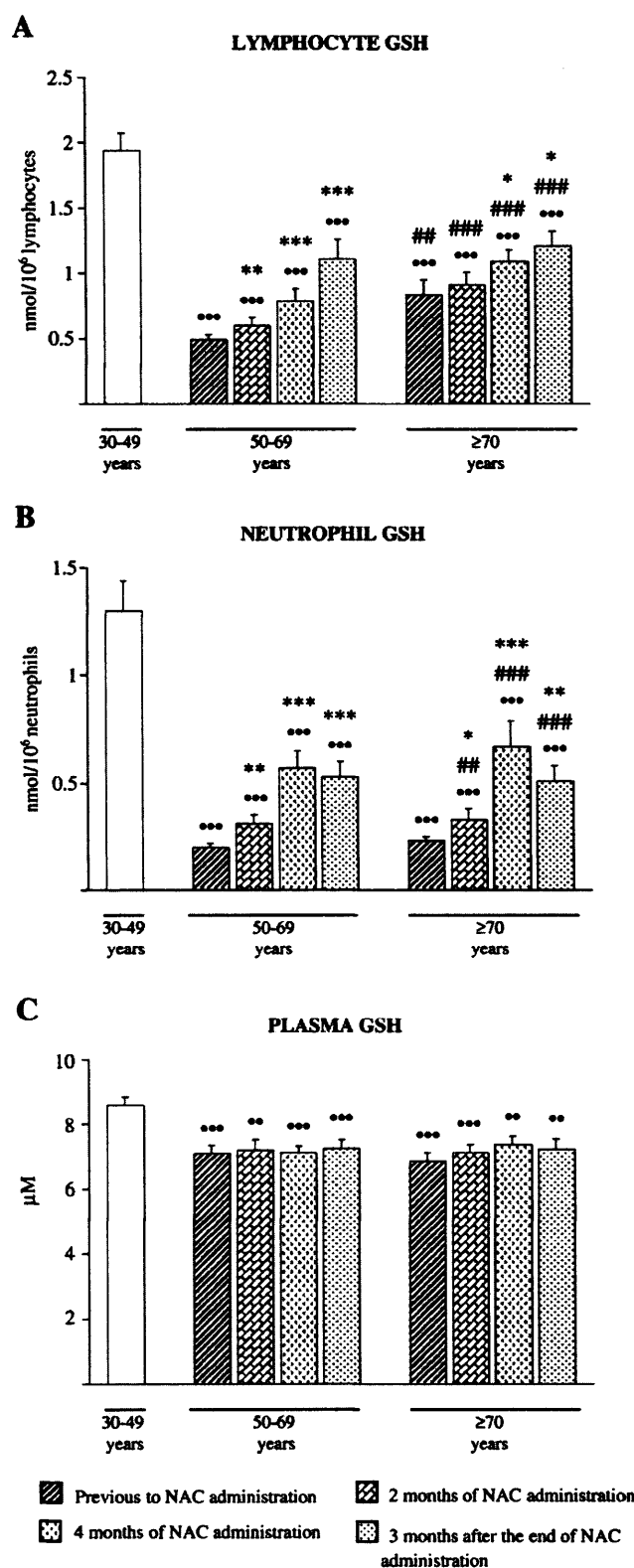


Fig. 4. GSH levels in human peripheral lymphocytes (nmol/ 10^6 lymphocytes) (A), neutrophils (nmol/ 10^6 neutrophils) (B), and plasma (μ M) (C) from 30- to 49-year-old women (controls), and postmenopausal women of 50–69 years and older than 69 before NAC administration, after 2 and 4 months of NAC administration, and 3 months after the end of treatment. Each column represents the mean \pm SE of 16–18 values corresponding to that number of subjects, each value being the mean of duplicate assays. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value before NAC administration. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value for 30- to 49-year-old women. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05 with respect to the value for 50- to 69-year-old women.

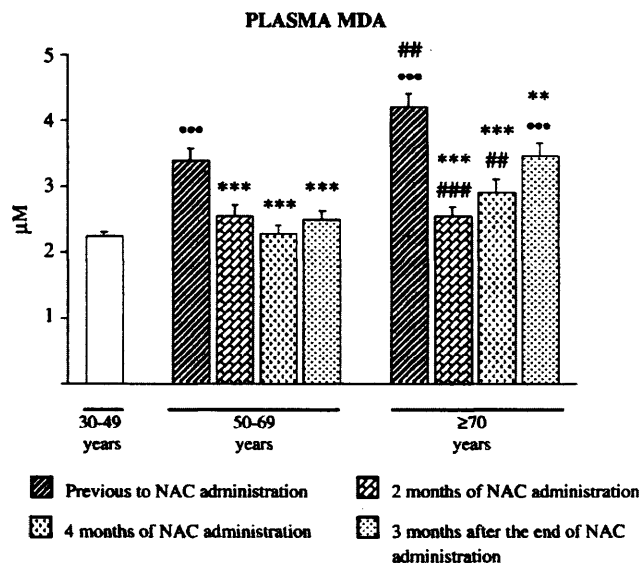


Fig. 5. MDA levels (μM) in plasma samples from 30- to 49-year-old women (controls), and postmenopausal women of 50-69 years and older than 69 before NAC administration, after 2 and 4 months of NAC administration, and 3 months after the end of treatment. Each column represents the mean \pm SE of 16-18 values corresponding to that number of subjects, each value being the mean of duplicate assays. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ with respect to the value before NAC administration. --- $P < 0.001$, - $P < 0.01$ with respect to the value for 30- to 49-year-old women. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ with respect to the value for 50- to 69-year-old women.

and in lymphocytes of 50- to 69-year-old women, $P < 0.05$ in lymphocytes of women > 69). This effect persisted in both lymphocytes and neutrophils of 50- to 69-year-old women ($P < 0.001$) and of those older than 69 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively), 3 months after the end of treatment.

Finally, plasma MDA levels (Fig. 5) increased with aging ($P < 0.001$), as observed in the 50- to 69-year-old women ($P < 0.001$ as compared with the values in the 30- to 49-year-olds) and more evidently in those older than 69 ($P < 0.01$ as compared with the values in the 50- to 69-year-olds). NAC decreased the levels of plasma MDA in both groups of postmenopausal women following 2 months of treatment ($P < 0.001$), which persisted after 4 months ($P < 0.001$) and 3 months after the end of treatment ($P < 0.001$ in 50- to 69-year-old women, $P < 0.01$ in women older than 69). Thus, NAC brought plasma MDA levels in 50- to 69-year-old postmenopausal women to values similar to those of younger women (control group) throughout the study. In addition, plasma MDA in women older than 69 decreased to the levels of 30- to 49-year-old women after 2 months of NAC treatment, and remained similar to those of 50- to 69-year-old women after 4 months of supplementation and 3 months after its end.

Discussion

The work described here demonstrates that a short period supplementation with NAC (600 mg/day) in postmenopausal women significantly improves lymphocyte and neutrophil function, as well as cytokine levels, which suffer age-related alterations resulting in impaired immune responses, bringing their values closer to those of healthy adult controls, and thus exerting a modulatory and not a merely stimulatory effect on the immune system. These results confirm previous data collected by our research group on biologically aged mice [20,21]. Moreover, NAC increases the decreased intracellular GSH content of leukocytes of postmenopausal women with no changes in plasma levels, whereas it diminishes the increased plasma MDA concentrations. In general, the beneficial effects of NAC in postmenopausal women are observed after 2 months of administration, being more evident after 4 months, and last, at least in part, 3 months after the end of supplementation.

The dysregulation as well as the overall decline in host immunity observed in the elderly are evidenced by the higher risk and severity of infections and the increased susceptibility to cancer with advanced age [4,32]. Age-related alterations in the immune response have been extensively studied, and T cells are considered to be most susceptible to immunosenescence [1,4,32]. With respect to cellular immunity, it is widely believed that the lymphoproliferative response to antigens and mitogens, such as PHA, decreases with age, which is coincident with the decline in IL-2 levels, in agreement with the present results [2,26,27,33,34]. Moreover, migration of mononuclear leukocytes to focus of infection was also found to be impaired in elderly women confirming previous work of our research group [23,27]. As regards innate immunity, a growing body of evidence is accumulating on the decrease in NK activity with aging [2,23,27]. In addition, although phagocytes were thought to play a less critical role in the immune dysfunction occurring in the elderly, recent studies point to a general decline in function of these cells, including phagocytosis, chemotaxis, as one major reason for the susceptibility and vulnerability to bacterial and viral infections among aged subjects, which stand out as the most common causes of illness and death in the elderly [23,27,30,33]. However, leukocyte adherence did not change in postmenopausal women, whereas in previous work by our research group, this function increased in elderly men and women [1]. Nevertheless, the control adult group used by De la Fuente et al. [1] was younger than that used in the present work. Adherence of leukocytes is the first event in immune and inflammatory response preceding migration to the focus of infection, and is especially sensitive to oxidative stress, being stimulated by free radicals [1]. Therefore, changes in this function might occur at early stages of the aging process, leading to the lack of differences we found. However, the present work did show that other immune parameters, closely related to the oxidative and inflammatory stress affecting cells, were increased in elderly women, that is, basal and stimulated superoxide anion in neutrophils and TNF- α in total blood culture responding to LPS, which agrees with several studies [27]. Finally, respect to IL-8, increased levels of this chemokine have been described in basal whole blood assays in elderly subjects, with no differences compared with adults under LPS-stimulating conditions, in agreement with the present results [35]. However, IL-8 is an early cytokine, thus, as mentioned above in regard to leukocyte adherence, change in its levels might occur early in life. Future studies considering young adult controls are needed to confirm these hypotheses.

As GSH is the major scavenger of ROS and certain immune functions are highly sensitive to those, even a moderate depletion of the intracellular GSH pool has important consequences for various leukocyte functions, those dependent on IL-2, such as T-proliferation and NK activity, being especially sensitive [36]. Several studies have reported decreased levels of plasma GSH in the elderly [37,38]. As described by Jones et al. [38], the striking and rapid decline in the plasma GSH antioxidant system occurs near the age of 50, which is compatible with the present results. Other authors have found decreased levels of lymphocyte GSH in the elderly, with 60- to 70-year-old subjects having levels lower than half those detected in controls from 20- to 40-year-old individuals [39]. Our results demonstrate that the GSH content of lymphocytes and neutrophils, as well as plasma GSH, decreases very markedly in 50- to 69-year-old postmenopausal women, and remains at similar levels in those older than 69. The important decline in GSH is coincident with the loss of estrogenic activity, which is in agreement with other research showing the induction of genes encoding antioxidant enzymes, such as those involved in GSH kinetics, by the interaction of estrogens with their receptors [40]. However, lymphocytes from women older than 69 have GSH levels higher than those of 50- to 69-year-old women, which could indicate a more preserved homeostasis in those cells than in neutrophils. Lymphocytes could produce more GSH or preserve it better in the face of the higher oxidative stress occurring in the elderly.

], which is also shown in the present work by the increased neutrophil superoxide anion and plasma MDA levels, the latter being predictor of mortality in aged humans [41]. Indeed, we have previously shown in mouse models that lymphocyte GSH increases the presence of oxidative stress, such as endotoxic shock [42], which those cells preserve their GSH content better than do macrophages [43].

As some authors have concluded that the changes in redox status with aging can be reversed [38], either nutritional or therapeutic interventions could be developed to accomplish this reversal. However, given that GSH does not enter the cell easily but is synthesized extracellularly, its direct administration is not a suitable procedure for increasing cell thiol levels [44]. Therefore, alternative strategies could be used to supply precursor amino acids [45] and/or inducers for GSH synthesis [46]. Nevertheless, the amino acid cysteine is easily oxidized and relatively unstable. In addition, some of its forms are not well absorbed, whereas cells and tissues exhibit relatively low transport activity for them. As most cells and tissues show high transport activity only for the reduced form of cysteine, the relatively stable synthetic cysteine derivative NAC stands out as a potentially effective supplement [15]. In addition to being a precursor of intracellular GSH [18], NAC stimulates the activity of cytosolic enzymes involved in GSH recovery, such as GSH reductase [47], and even acts as direct antioxidant by reducing ROS through its thiol group [19]. Indeed, our results provide evidence that NAC could exert its beneficial effects on immune function significantly by increasing the total GSH pool. Besides, although leukocyte GSH significantly increases with NAC administration in postmenopausal women in both their twenties and seventies, GSH levels do not reach the values measured in younger adult women, which may indicate decreased activity and/or expression of the enzymes involved in GSH synthesis in the elderly [1].

The administration of NAC has been proven, in previous studies, to be a strategy for enhancing immune defenses when there is diagnostic evidence of glutathione or cysteine deficiency. Breithaupt et al. [49] showed, in two randomized placebo-controlled studies, that NAC administration in HIV-infected patients, who suffer from abnormally low cysteine and glutathione levels [50], leads to significant enhancement of several immunological functions, including antigen-induced cell proliferation and restoration of NK cell activity to near-normal levels. Other authors [51] have reported significantly improved 2-year survival rates among these patients after NAC treatment, although general acceptance of this study was compromised by the lack of rigorous randomization. Besides, some authors have considered the aging process as a glutathione or cysteine deficiency syndrome [15]. Accordingly, Breithaupt et al. [52] found that NAC treatment in aged rhesus monkeys reverses the decreased mitogenic responses and IL-2 synthesis in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The present results indicate that NAC supplementation increases impaired PHA-induced lymphoproliferation and IL-2 levels, as well as NK activity, in elderly women.

Moreover, this work shows that the increase in levels of LPS-induced TNF- α in whole blood assays with aging are decreased by NAC treatment. This is in accordance with previous studies that demonstrated that the increase in plasma TNF- α concentration in frail elderly individuals subjected to physical exercise was completely prevented by cysteine supplementation [53]. In addition, we observed a significant reduction in LPS-induced TNF- α in cultures of peritoneal leukocytes from prematurely aged mice after NAC treatment [21].

TNF- α is known to be induced by the transcription factor NF- κ B and, accordingly, expressed under oxidative conditions, as NF- κ B has been shown to be enhanced by ROS [54]. Furthermore, NF- κ B was found to be inhibited by antioxidants such as NAC, which thereby prevented excessive TNF- α levels and inflammation in models of endotoxic shock [43,55]. This study shows that the increased basal and stimulated superoxide levels in neutrophils from elderly subjects are

decreased by NAC, which agrees with the decline in increased LPS-induced TNF- α . At this point, it is necessary to consider that the proinflammatory cytokines and oxidant molecules produced during the inflammatory response, following infection, may be beneficial or detrimental to the organism, depending on their levels and the conditions under which they are produced. Thus, excessive levels of those compounds could be deleterious, as they are related to chronic inflammatory and autoimmune diseases [56]. Other authors have also found lower neutrophil respiratory bursts in response to different agents in healthy volunteers after 14 days of NAC administration (600 mg/day) [57]. In this respect, although ROS production is an important mechanism of microorganism destruction by phagocytes, there is evidence of a positive correlation between low levels of superoxide anion and bactericidal activity [58], whereas the increased levels that we found in neutrophils of postmenopausal women before NAC supplementation could be harmful to immune cells and the surrounding cells and tissues [2]. Moreover, Wolach et al. [59] showed that excessive superoxide generation has no parallel effect on bactericidal capacity. However, future studies on bacterial killing by neutrophils throughout aging and after NAC administration are needed. In addition, the decrease in the oxidative status of elderly women after NAC treatment was further supported in the present work by the reduced plasma MDA levels. In this respect, although plasma MDA levels measured after derivatization with TBA and separation by HPLC, similarly to the procedure used in the present work, have previously been described as a biomarker of oxidative stress [60], the elevated temperature required for derivatization appears to catalyze artifactual MDA formation, leading to overestimation of MDA [61]. Thus, future studies using alternative methods with milder derivatization conditions for MDA measurement would be advisable to confirm the present result. Additionally, the production of adhesion molecules and neutrophil chemoattractants, such as IL-8, may also be upregulated via activation of NF- κ B and excess ROS generated by phagocytes [62], whereas our present results show a decrease in leukocyte adherence and subsequent increase in chemotactic function of immune cells despite decreased LPS-induced IL-8, in elderly women treated with NAC. This means that less signal would be needed for neutrophils to migrate to the focus of infection in a more effective way. These findings agree with previous results by our research group showing that an adequate dose of NAC in prematurely aged mice leads to reduced adherence and enhanced chemotaxis of both peritoneal lymphocytes and phagocytes [20]. In the same study, Puerto et al. [20] observed improvement in the phagocytic activity of peritoneal macrophages in prematurely aged animals after NAC treatment, which is in accordance with the results of the present work on peripheral neutrophils. Also, previous *in vivo* studies with healthy volunteers (NAC 600 mg daily) reported beneficial effects on neutrophil phagocytosis [63].

In conclusion, the striking decline in the GSH content of leukocytes with aging stands out as one potential major reason for the functional impairment of immune cells with age, which leads to an increase in the incidence and severity of infections, as well as other immune system-related diseases such as cancer, and eventually causes higher morbidity and mortality in the elderly. The present work points out that NAC administration could be considered an efficient strategy, even in short-term treatments and at advanced age, to enhance the decreased intracellular GSH levels of leukocytes, which seems to be the key reason for the significant improvement in immune function after NAC treatment. NAC leads to extended strengthening of immune defenses in postmenopausal women and could thereby contribute significantly to improve the health and quality of life of elderly individuals. However, because we focused only on women to avoid gender variability, the present results should not be generalized. Although previous research has shown no gender differences with respect to the changes in GSH content with age [39], future studies on men and women are needed.

Finally, it is important to remark, as another conclusion drawn from the present work, that the determination of plasma GSH concentration should be considered with caution in studies assessing the levels of this antioxidant in an organism, as it could be unrelated to the level of other localizations, such as the peripheral leukocytes, because it is synthesized intracellularly. This suggests that we should be more critical of conclusions drawn from results obtained exclusively from plasma samples, which is the biological sample most often used.

Acknowledgment

The authors thank Zambon S.A. (Zambon Group, Spain) for its funding support of this work.

References

- [1] Pawelec, G.; Barnett, Y.; Forsey, R.; Frasca, D.; Globerson, A.; McLeod, J.; Caruso, C.; Franceschi, C.; Fülöp, T.; Gupta, S.; Mariani, E.; Mocchegiani, E.; Solana, R. T-cells and aging. *Front. Biosci.* 7:d1056–d1183; 2002.
- [2] De la Fuente, M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008, in press.
- [3] Izgüt-Uysal, V. N.; Tan, R.; Bülbül, M.; Derin, N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol. Int.* 28:517–521; 2004.
- [4] Castle, S. C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin. Infect. Dis.* 31:578–585; 2000.
- [5] Wayne, S. J.; Rhyne, R. L.; Garry, P. J.; Goodwin, J. S. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J. Gerontol.* 114:80–88; 1990.
- [6] Guayerbas, N.; De la Fuente, M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev. Comp. Immunol.* 27:339–350; 2003.
- [7] Levy, S. M.; Herberman, R. B.; Lee, J.; Whiteside, T.; Bedle, M.; Heiden, L.; Simons, A. Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 10:536–539; 1991.
- [8] Ferguson, F. G.; Wikby, A.; Maxson, P.; Olsson, J.; Johansson, B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J. Gerontol.* 50:378–382; 1995.
- [9] Guayerbas, N.; Catalán, M.; Victor, V. M.; Miquel, J.; De la Fuente, M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav. Brain Res.* 134:41–48; 2002.
- [10] Guayerbas, N.; Puerto, M.; Victor, V. M.; Miquel, J.; De la Fuente, M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp. Gerontol.* 37:249–256; 2002.
- [11] Franceschi, C.; Monti, D.; Sansoni, P.; Cossarizza, A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol. Today* 16:12–16; 1995.
- [12] Knight, J. A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145–157; 2000.
- [13] Dröge, W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.* 37:1333–1345; 2002.
- [14] Hernanz, A.; Fernández-Vivancos, E.; Montiel, C.; Vázquez, J. J.; Arnalich, F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 67:1317–1324; 2000.
- [15] Dröge, W. Oxidative stress and aging: is aging a cysteine deficiency syndrome? *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:2355–2372; 2005.
- [16] Nigam, S.; Schewe, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:167–181; 2000.
- [17] Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81–128; 1991.
- [18] De Flora, S.; Izzoti, A.; D'Agostini, F.; Cesarone, C. F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am. J. Med.* 91:122–130; 1991.
- [19] Gressier, B.; Cabanis, A.; Lebegue, S.; Brunet, C.; Dine, T.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J. C. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 16:9–13; 1994.
- [20] Puerto, M.; Guayerbas, N.; Victor, V. M.; De la Fuente, M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature aging. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73:797–804; 2002.
- [21] Guayerbas, N.; Puerto, M.; Alvarado, C.; De la Fuente, M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice. *J. Appl. Biomed.* 3:199–205; 2005.
- [22] De la Fuente, M. Effect of antioxidants on immune system aging. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56:S5–S8; 2002.
- [23] De la Fuente, M.; Hernanz, A.; Vallejo, M. C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid. Redox. Signal.* 7:1356–1366; 2005.
- [24] De la Fuente, M.; Carrasco, M.; Hernanz, A. Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J. Endocrinol.* 153:475–483; 1997.
- [25] Hernanz, A.; Tato, E.; De la Fuente, M.; de Miguel, E.; Arnalich, F. Different effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vas intestinal peptide on interleukin-1 β , interleukin-6 and tumour necrosis factor production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J. Neuroimmunol.* 71:25–30; 1996.
- [26] De la Fuente, M.; Victor, V. M. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol. Cell. Biol.* 78:49–54; 2000.
- [27] De la Fuente, M.; Hernanz, A.; Guayerbas, N.; Victor, V. M.; Arnalich, F. Vita ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Radic. Res.* 42:272–280; 2008.
- [28] Carrasco, M.; Hernanz, A.; De la Fuente, M. Effect of cholecystikinin and gastrin human peripheral blood lymphocyte functions, implication of cyclic AMP interleukin-2. *Regul. Peptides* 70:135–142; 1997.
- [29] Tietze, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27:502–522; 1969.
- [30] De la Fuente, M.; Hernanz, A.; Guayerbas, N.; Álvarez, P.; Alvarado, C. Changes age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxid stress of senescence. *Cell. Mol. Biol.* 50:683–690; 2004.
- [31] Chirico, S.; Smith, C.; Marchant, C.; Mithison, M. J.; Halliwell, B. Lipid peroxidation in hyperlipemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic. Res.* 19:51–57; 1993.
- [32] Miller, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 273:7 1996.
- [33] Ginaldi, L.; De Martinis, M.; D'Onofrio, A.; Marini, L.; Loreto, M. F.; Quagliano, D. Immune system in the elderly III. Innate immunity. *Immunol. Res.* 20:117–1999.
- [34] Ginaldi, L.; De Martinis, M.; Modesti, M.; Loreto, M. F.; Corsi, M. P.; Quagliano, D. Immunophenotypic changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontol.* 242–248; 2000.
- [35] Gabriel, P.; Cakman, I.; Rink, L. Overproduction of monokines by leukocytes stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp. Gerontol.* 37:235–247; 2002.
- [36] Dröge, W.; Schulze-Osthoff, K.; Mihm, S.; Galter, D.; Schenk, H.; Eck, H. P.; Roßmüller, H. Function of glutathione and glutathione disulfide in immun and immunopathology. *FASEB J.* 8:1131–1138; 1994.
- [37] Yang, C. S.; Chou, S. T.; Liu, L.; Tsai, P. J.; Kuo, J. S. Effect of aging on human glutathione concentrations as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 674:23 1995.
- [38] Jones, D. P.; Mody, V. C. Jr.; Carlson, J. L.; Lynn, M. J.; Sternberg, P. Jr. Redox of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1290–1300; 2002.
- [39] Van Lieshout, E. M. M.; Peters, W. H. M. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinog.* 19:1873–1875; 1998.
- [40] Viña, J.; Borras, C.; Gambini, J.; Sastre, J.; Pallardó, F. V. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *FEBS Lett.* 23:2541–2545; 2002.
- [41] Huerta, J. M.; González, S.; Fernández, S.; Patterson, A. M.; Lasheras, C. peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: a year longitudinal study. *Free Radic. Res.* 40:571–578; 2006.
- [42] Victor, V. M.; Guayerbas, N.; De la Fuente, M. Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Cell Biochem.* 229:107–111; 2002.
- [43] Victor, V. M.; Rocha, M.; De la Fuente, M. N-Acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic. Res.* 37:919–929; 2003.
- [44] Puri, R. N.; Meister, A. Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl into liver and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5228–5260; 1983.
- [45] Anderson, M. E.; Luo, J. L. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Liver Dis.* 18:415–424; 1998.
- [46] Dhakshinamoorthy, S.; Long, D. J. 2nd.; Jaiswal, A. K. Antioxidant regulatory genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr. To Regul.* 36:201–216; 2000.
- [47] Banachlocha, M. M. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med. Hypotheses* 56:472–477; 2002.
- [48] Liu, H.; Wang, H.; Shenvi, S.; Hagen, T. M.; Liu, R. M. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019:346–349; 2002.
- [49] Breitkreutz, R.; Pittak, N.; Nebe, C. T.; Schuster, D.; Brust, J.; Beichert, M.; Ha Daniel, V.; Edler, L.; Dröge, W. Improvement of immune functions in HIV infection by sulphur supplementation: two randomized trials. *J. Mol. Med.* 78:55–62; 2002.
- [50] Dröge, W.; Eck, H. P.; Näher, H.; Pekar, U.; Daniel, V. Abnormal amino acid concentrations in the blood of patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) may contribute to the immunological defect. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369:143–148; 1988.
- [51] Herzenberg, L. A.; De Rosa, S. C.; Dubs, J. G.; Roederer, M.; Anderson, M. T.; Elia, Deresinski, S. C.; Herzenberg, L. A. Glutathione deficiency is associated with paired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1967–1972; 1997.
- [52] Brethaupt, T.; Eylar, E. H.; Baez, I.; Vazquez, A.; Colon-Martinez, S.; Rodríguez Kessler, M. N-Acetylcysteine (NAC) reverses the supposed mitogenic response of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from aged rhesus monkeys. *FASEB J.* 10:1849; 1996.
- [53] Hauer, K.; Hildebrandt, W.; Sehl, Y.; Edler, L.; Oster, P.; Dröge, W. Improve muscular performance and decrease in tumor necrosis factor level in old age antioxidant treatment. *J. Mol. Med.* 81:118–125; 2003.
- [54] Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol.* 82:47–95; 2002.

- 5] Victor, V. M.; De la Fuente, M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic. Res.* **37**:19–27; 2003.
- 6] Grimbé, R. F. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* **14**:634–640; 1998.
- 7] Sadowska, A. M.; Manuel-y-Keenoy, B.; Vertongen, T.; Schippers, G.; Radomska-Lesniewska, D.; Heytens, E.; De Backer, W. A. Effect of N-acetylcysteine on neutrophil activation markers in healthy volunteers: in vivo and in vitro study. *Pharmacol. Res.* **53**:216–225; 2006.
- 8] Boxer, L. A. Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. In: Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A. (Eds.), *Hematology*, 5th ed. McGraw-Hill, New York; 1995.
- 9] Wolach, B.; Gavrieli, R.; Pomeranz, A. Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions. *Pediatr. Res.* **48**:369–373; 2000.
- [60] Nielsen, F.; Mikkelsen, B. B.; Nielsen, J. B.; Andersen, H. R.; Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* **43**:1209–1214; 1997.
- [61] Fenaille, F.; Mottier, P.; Turesky, R. J.; Ali, S.; Guy, P. A. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J. Chromatogr. A* **921**:237–245; 2001.
- [62] Collins, T. Biology of disease: endothelial nuclear factor-KB and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* **68**:499–508; 1993.
- [63] Urban, T.; Akerlund, B.; Jarstrand, C.; Lindeke, B. Neutrophil function and glutathione-peroxidase (GSH-px) activity in healthy individuals after treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Biomed. Pharmacother.* **51**:388–390; 1997.

Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Aging in a Triple-Transgenic 3×Tg-AD Mouse Model for Alzheimer’s Disease and Its Relation with Longevity

Lydia Giménez-Llort^a Lorena Arranz^b Ianire Maté^b Mónica De la Fuente^b

^aDepartment of Psychiatry and Forensic Medicine, Institute of Neuroscience, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, and ^bDepartment of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Immunosenescence · Triple-transgenic · 3×Tg-AD mice · Leukocytes · Chemotaxis · Lymphoproliferation · Stress · Anxiety · Behavioral and psychological symptoms of dementia

Abstract

In the present work, we briefly review the evidence on the key role played by the neuroimmunoendocrine network in the etiopathogenesis of Alzheimer’s disease (AD) and provide new behavioral, immune and endocrinological data obtained on old male and female triple-transgenic 3×Tg-AD mice harboring *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} and *tau*_{P301L} transgenes in contrast to wild-type animals. The results indicate that several aspects of the impairment of the neuroimmunoendocrine network that occurs with aging are more evident in the 3×Tg-AD mice, especially in males. This supports the hypothesis of a premature immunosenescence as a pathogenically relevant factor in AD which was found to be enhanced in the 3×Tg-AD males, suggesting that this could also be responsible for the increased morbidity and mortality of these subjects. Therefore, future research on strategies that could improve the immune system and the other regulatory systems, such as the nervous and the endocrine system, as well as their communication, could have preven-

tive and/or therapeutical effects on that disease. The results also show the relevance of gender differences that should be taken into consideration in both basic and clinical research for assessing new strategies for the control of AD.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

The neurobiology of aging has been one of the most rapidly expanding areas of scientific endeavor over the past 2 decades. Most efforts have been focused on understanding the neuronal mechanisms underlying age-related neurodegenerative disorders, whose prevalence in the elderly is dramatically increasing in parallel to that of life expectancy and social aging. This is the case for Alzheimer’s disease (AD), the most common neurodegenerative disorder and cause of senile dementia with complex neuropsychiatric symptoms, and the target of a large and important body of clinical and basic research. The main pathological hallmarks of AD are the aberrant protein aggregates, amyloid plaques, comprising the amyloid β ($A\beta$) peptide, and neurofibrillary tangles that consist of hyperphosphorylated tau protein. Other neurodegenerative changes include progressive neuronal and synaptic dysfunction and, eventually, cell death [1–3]. Upregula-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
1021–7401/08/0156–0331\$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Lydia Giménez-Llort
Department of Psychiatry and Forensic Medicine
Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona
ES-08193 Bellaterra (Spain)
Tel. +34 93 581 2378, Fax +34 93 581 1435, E-Mail lidia.gimenez@uab.cat

tion of microglia and astrocytes in a kind of chronic inflammatory process has also been reported as prominent features of AD brain [4–7] and is also observed in animal models for this disease [8]. Cholinergic deficits and increased oxidative stress hypothesis do also explain some relevant aspects of the complex pathological pattern observed in AD [9].

Modeling these neuronal and behavioral deficits of AD in animal models has been challenging [10], although advances in the genetics of the early-onset familial form of AD and the genetic risk factors involved in sporadic cases [11], together with those in gene transfer technology, finally provided valuable animal models that complement the traditional cholinergic approaches studying learning and memory deficits resulting from cholinergic deafferentation [12]. Thus, animal models based on gene transfer techniques have made it possible to study the effects of overexpression of mutant human amyloid precursor protein (APP) and presenilin-1 (PS1) or presenilin-2 (PS2) genes in rodents, and several mutations in these genes have been identified that can cause autosomal dominant familial AD [9]. In fact, the first attempts to produce AD-like pathology in transgenic mice were founded on premature aging with AD-like pathology, as developed by Down syndrome patients, suggesting a role for overexpression of chromosome 21-encoded APP [13]. Since then, several transgenic animal models of AD based on expression of mutant familial AD transgenes have been developed [14] and a step forward was achieved in 2003 [15], when the laboratory of Prof. Frank M. LaFerla at the University of California Irvine developed the 3×Tg-AD mice, the first triple-transgenic mice harboring *PS1_{M146V}*, *APP_{Swe}* and *tau_{P301L}* transgenes. This animal model mimics both amyloid and tau AD neuropathologies in an age-dependent manner in disease-relevant brain regions and reveals the important role of the intraneuronal accumulation of oligomeric Aβ in the etio-pathogenesis of the disease [15]. The 3×Tg-AD mice present synaptic and cholinergic deficits [15–17], the characteristic reactive gliosis inflammatory profile [8] as well as cognition impairment [18] and behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD)-like behaviors [10].

The present work is aimed to review the evidence on the key role played by the neuroimmunoendocrine network in the pathogenesis of AD and also to provide new insights from behavioral, immune and endocrinological data obtained in our old male and female triple-transgenic 3×Tg-AD mice harboring *PS1_{M146V}*, *APP_{Swe}*, *tau_{P301L}* transgenes compared to wild-type animals.

The Neuroimmunoendocrine Network in Aging

There is considerable evidence of age-related decline of the regulatory systems, namely the nervous, the endocrine and the immune systems as well as an impairment of the neuroimmunoendocrine network [19–21]. With aging, the types and levels of cytokines that contact with the nervous and endocrine cells change. Presently, it is accepted that the age-related increase in the inflammatory cytokine and oxidant compounds, which the immune cells produce [22], can modify the nervous function [23]. In addition, there are changes in the neuroendocrine modulation of immune response, which are shown at different levels such as the changes in the innervation and irrigation of immune organs, in the number and affinity of leukocyte receptors for neurotransmitter and hormones, as well as in the intracellular signals and the resulting response of the immune cells to them [20, 24, 25]. Thus, age-related neuroimmunoendocrine network alterations can lead to loss of homeostasis and thereby may importantly contribute to the progress of aging and consequently to the age-related increase in morbidity and mortality (fig. 1) [22].

In relation to the gender differences in the changes of the neuroimmunoendocrine network with aging, it is presently well documented that females live longer than males in a great range of animal species, including humans. Many factors could contribute to this gender-dependent longevity, mainly those related to the behavioral and physiological differences between males and females. As regards behavior, seeking sensations as well as taking risks are much more frequent traits in male than in females [26], which contributes to increase male mortality at all ages in humans and other species [27, 28]. Thus, cortisol/corticosterone has been found to be inversely associated with risk-taking behaviors [29] and the plasma concentrations of this hormone are considerably higher in adult females than in males [30, 31] which is thought to be triggered by estrogens [32]. Supporting this idea, some authors have described decreasing levels of cortisol with age in females only [33], whereas they are likely less dysregulated in older men compared to older women [34]. However, these changes have not reached a full consensus among studies and still remain controversial. Interestingly, glucocorticoid feedback inhibition has been demonstrated to be reduced in the elderly and in both genders [35], whereas the anti-inflammatory efficacy of these hormones has been shown to be reduced with age [36]. In view of the neuroimmunoendocrine communication, a significant gen-

der dimorphism in both humoral and cell-mediated immune functions is also evident, which plays a major role in the different life span of males and females. The immune system in females has been reported to work more efficiently and effectively for longer time than the immune system in males [37]. Accordingly, females show stronger antibody [38] and cell-mediated [39] immune responses than males, and estrogens have been suggested to be responsible for this higher immunocompetence of females [39, 40]. Besides, estrogens have been found to upregulate the expression of antioxidant enzymes, resulting in increased levels of reduced glutathione [41] that can preserve the immune function along the aging process [22, 42–44]. Moreover, the administration of estrogen to rats improves several immune cell functions [unpubl. data].

Neuroimmunomodulation and AD: Role of Inflammation and the Immune System

Among various factors involved in the pathogenesis of AD, a large body of evidence supports the hypothesis of a direct contribution of the inflammatory response to amyloid plaque progression and, thus, to the neurodegeneration associated with AD. Conversely, A β itself has been shown to act as a pro-inflammatory agent [45, 46]. Accordingly, the ‘bystander damage hypothesis’ [47] is based on microglial dysfunction leading to autoaggressive microglial cells that produce neurotoxins in response to A β exposure in AD. The activation of inflammatory cells performed by microglia and astrocytes, which are found upregulated in AD brain, results in the secretion of cytokines, such as IL-1 and TNF- α , and chemokines as well as the release of reactive oxygen species and nitrogenous compounds, all of which exacerbate the pathology [5, 48]. Further indication of the pathophysiological role of inflammation in AD is shown not only by the presence of these inflammatory mediators in AD brains, including pro-inflammatory cytokines, but also of acute-phase proteins and the full complement cascade [49–51].

With respect to the role of the immune system outside the brain, a generally blunted secretory response of immune cells to activating stimuli in AD has been reported, with a decline of phagocytic activity suggested as an early event in the pathogenic chain [52]. Other studies suggest that patients of AD display a heritable innate pro-inflammatory phenotype producing more pro-inflammatory cytokines and less anti-inflammatory cytokines

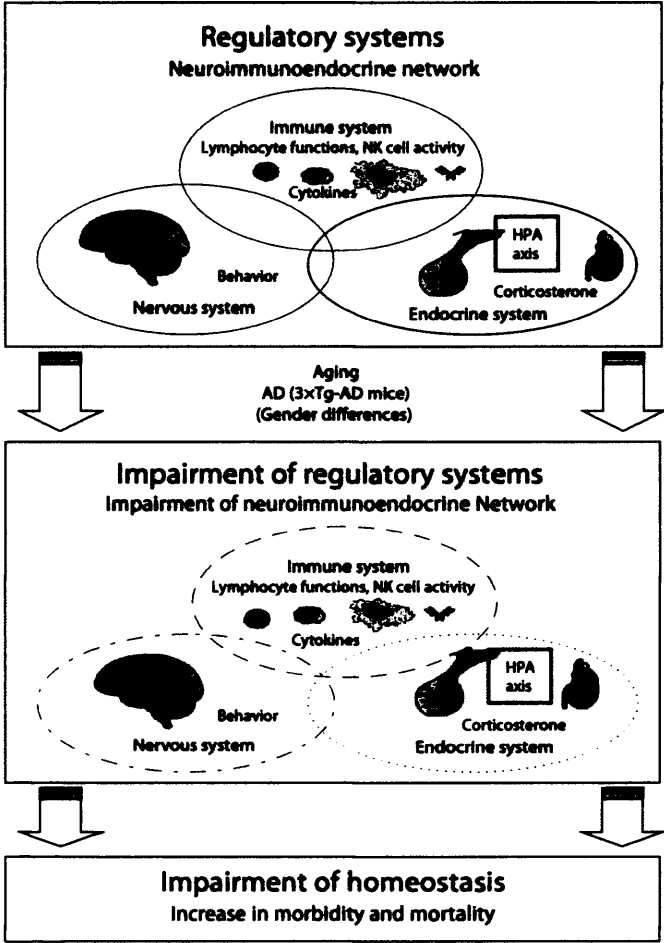


Fig. 1. Regulatory systems and aging. There is an age-related decline of the regulatory systems, namely the nervous (studied in the present work using several behavior parameters), the endocrine (studying plasma corticosterone levels) and the immune systems (studying several lymphocyte functions and natural killer cell activity). With aging there is also an impairment of the neuroimmunoendocrine network, in which cytokines play an important role. These age-related alterations of regulatory systems show differences by gender and in pathological conditions such as neurodegenerative illness like AD. The impairment of the neuroimmunoendocrine network leads to loss of homeostasis and consequently to the age-related increase in morbidity and mortality. NK = Natural killer.

than control subjects without dementia. Thus, subjects who display a high blood IL-1 β /IL-10 ratio have 13.0-fold higher odds (95% CI 2.1–82) to suffer dementia, suggesting that the cytokine profile determined by the whole blood assay may have a predictive value in AD [53]. Conversely, over 20 epidemiological studies suggest a potential benefit of anti-inflammatory interventions delaying

the onset and slowing down the progression of AD [4, 5, 54, 55], probably through a reduction of the amyloid burden [56]. In parallel, it has recently been demonstrated that prophylactic treatment of 3×Tg-AD mice with ibuprofen reduces intraneuronal oligomeric Aβ and cognitive deficits, and prevents hyperphosphorylated tau immunoreactivity [57]. Genetic studies reveal that IL-1 and IL-6 polymorphisms both associated with higher cytokine levels [58–60] are found enriched in AD patients, although the relatively low frequencies of these gene variants cannot explain the inflammatory profile that underlies the development of AD in the population at large [53]. Still, some discrepancies in these systemic findings have been reported, but they seem to be mostly attributed to technical variations, different inclusion criteria, different stage of dementia and the influence of comorbidity and pharmacological treatments.

The above-mentioned facts support the increasing evidence on the key role played by the immune system in the etiopathogenesis of AD. However, the data are still scarce, preliminary and contradictory, especially with respect to the changes in the immune response in subjects with this pathology. Thus, presently the causal or pathogenic role of the immune dysfunction in AD remains controversial. Several studies support a causal role of an underlying general impairment of the immune response in AD. In addition, a decrease in amyloid burden is achieved through immune stimulation. For instance, Aβ immunotherapy reduces Aβ oligomers and reverses the deficits in proteasome activity observed in young 3×Tg-AD mice [61]. Reduction of amyloid burden through immunization with Aβ has also been demonstrated in PDAPP mice [62] with evidence of peripheral clearance of cerebral Aβ protein [63]. Results of immune stimulation with lipopolysaccharide (LPS) are more controversial, since in APP PS1 transgenic mice it is able to reduce Aβ plaques [64, 65], while in 3×Tg-AD mice LPS-induced inflammation does not affect APP processing, but significantly exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway [8].

In addition, the process of aging agrees with the causal role of the immune system on AD. Since, according to epidemiological studies, advanced age is considered the most consistent risk factor for AD [9], the age-related changes of the immune system, that is, immunosenescence, should be considered to understand the development of this pathology. The effects of aging on the immune system are widespread and extend from hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors in the bone marrow and thymus to mature lymphocytes in second-

ary lymphoid organs. These changes combine to result in a diminution of immune responsiveness in the elderly [66]. Immunosenescence associated with the aging process involves both acquired and innate immunity changes, with a decrease in several lymphocyte and phagocyte functions [43, 44, 52, 67–70] as well as an increase in other leukocyte functions such as adherence to tissues and production of oxidant and inflammatory cytokines [22, 43].

Recent research has proposed that various immune functions such as phagocytic activity, not only the pro-inflammatory response, are hampered in AD [52]. Thus, AD patients would display systemic immunological alterations in terms of a general dysregulation or impairment of the cellular immune response to stimulating agents, which do not only reflect an epiphenomenon, but may be causally related to AD pathology. Thus, an impaired immune response may be considered as a pathogenically relevant factor in AD. Regarding the putative role of aging in AD, Richartz et al. [52] also assume a premature immunosenescence contribution to the AD pathology. Thus, it is possible that the immunological alterations in AD can be understood as a sign of advanced immunological senescence and that the AD subjects show more striking immunological changes compared to healthy aged people.

With all the above in mind (fig. 1), we decided to study the effect of aging and gender on the neuroimmunoenocrinological network (that is, behavior – immunological function – corticosterone) of a standard wild-type C57b/129 mouse strain as well as the impact of AD on it. Therefore, we carried out an experiment in which adult (6 months of age) and old (15 months of age) female and male wild-type (nontransgenic, NTg) animals were used and also compared them to old female and male 3×Tg-AD mice (of the same wild-type strain, but harboring *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe} and *tau*_{P301L}). In the first place, life span of wild-type NTg and 3×Tg-AD mice recorded from 6 to 15 months of age evidenced an increased mortality in the triple-transgenic group compared to age-matched wild-type NTg mice. The low mortality ratio (10%) in old NTg males was increased to 40% in the 3×Tg-AD group. The behavior of animals was assessed by classical tests and resulted in an increase in anxiety-related behaviors (see more details above). At the end of the behavioral tests, the animals were sacrificed to obtain plasma for the analysis of corticosterone. The thymus and spleen were immediately removed in aseptic conditions. All these procedures were performed in accordance with 86/609/EEC regarding the use of an-

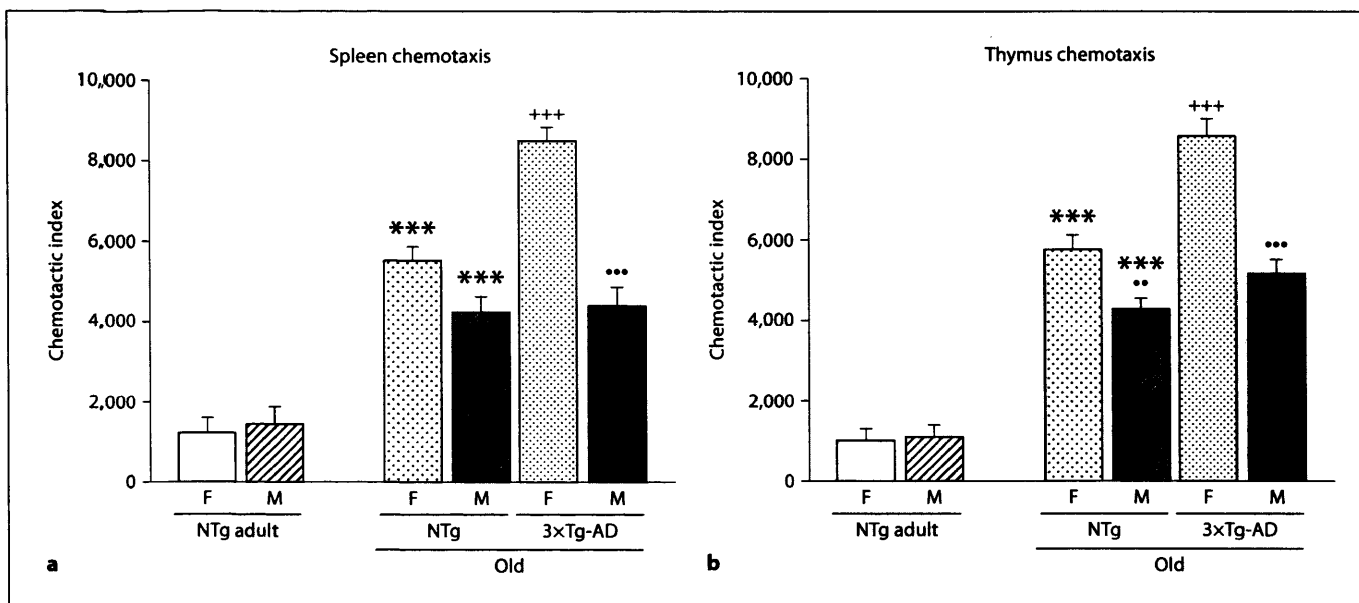


Fig. 2. Chemotactic index from spleen (a) and thymus (b) lymphocytes. Each column represents the mean \pm SEM of 6–10 values corresponding to the same number of subjects (8–10, NTg adult, NTg old, 3xTg-AD female old; 6, 3xTg-AD male old). Each value is the mean of duplicate assays. ANOVA was followed by Tukey

post hoc comparisons. *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; +++ $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. females. F = Females; M = males.

imals for experimental procedures. Several immune functions were studied in leukocytes from spleen and thymus, namely, chemotaxis, lymphoproliferation both in basal conditions and in response to Con A and LPS mitogens, natural killer cell activity as well as levels of IL-2 and TNF- α cytokines in the culture supernatants from Con A and LPS, respectively. In addition, since the levels of glutathione in leukocytes are related to their function [44], we also analyzed the levels of this endogenous antioxidant. The results confirm that old female 3xTg-AD mice show an exacerbation of the age-dependent increase in the chemotactic index from spleen and thymus lymphocytes (fig. 2) [71]. The tendency to decrease the basal lymphoproliferation with age is similar in cells from 3xTg-AD and NTg mice. Nevertheless, the mitogen LPS-induced proliferation of male spleen cells is decreased in male 3xTg-AD with respect to old NTg mice (fig. 3). A decreased Con A and LPS lymphoproliferative response in thymus has been observed in old 3xTg-AD and NTg mice compared to adult NTg mice (fig. 3). The age-related impairment of natural killer cell activity [72] was observed in thymus of 3xTg-AD mice with the decrease being more significant in males than females and compared to age- and gender-matched NTg

mice (fig. 4). The age-dependent increase in the release of TNF- α by leukocytes [22, 44] is raised in the spleen of both genders of 3xTg-AD mice with respect to the values in age- and gender-matched NTg mice (fig. 5). However, the release of IL-2 by those leukocytes increases in female but decreases in male 3xTg-AD mice (fig. 5). Thus, in general, there are age-related changes in the immune functions studied in NTg mice, several of them are more increased in 3xTg-AD mice, especially in males. Since the immune system function is a good marker of health and longevity [73] and several of the functions studied have been proposed as markers of biological age and predictors of longevity [22, 43, 74, 75], the results obtained could explain the shorter life span of the 3xTg-AD mice, especially in the males where it is only 40%, because of their premature immunosenescence. These are the first results on age changes in the immune functions studied in this strain of mice and in 3xTg-AD mice. It is evident that it is difficult to do a strict comparison with the results published on other strains of mice. Moreover, we have observed different results in the evolution of the immune functions with aging depending on the compared ages, strain of mice and gender [21, 39, 75].

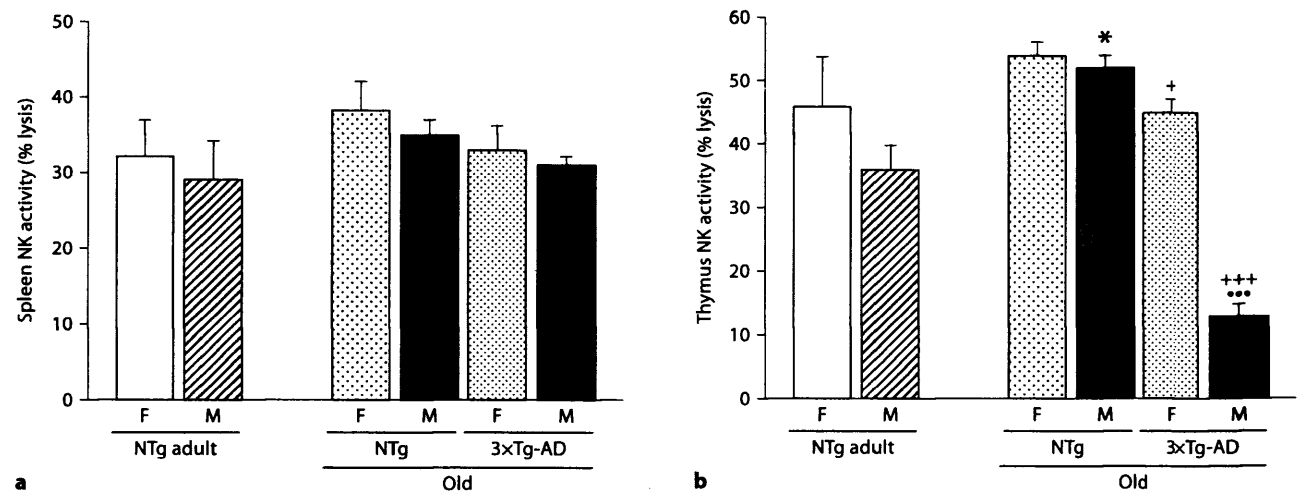
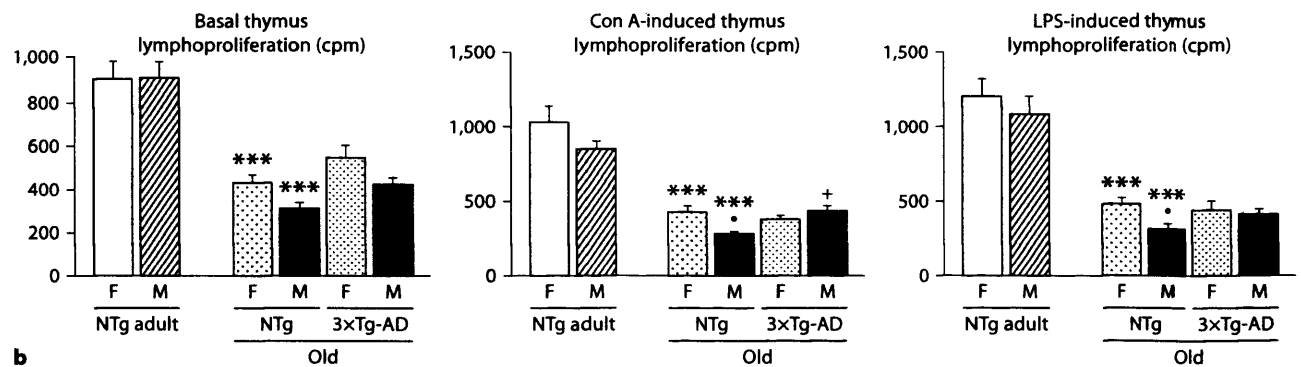
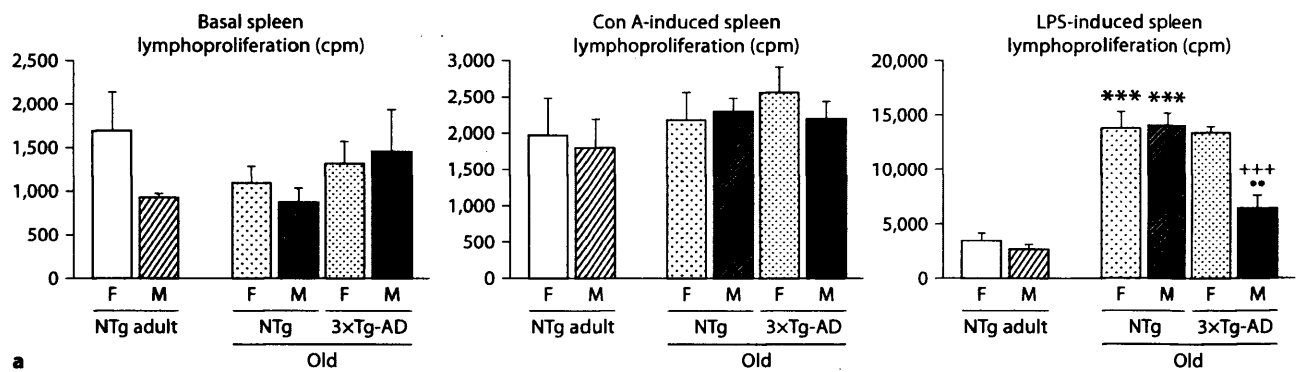


Fig. 3. Lymphoproliferation in basal, as well as Con A- and LPS-stimulated conditions from spleen (a) and thymus (b). Each column represents the mean \pm SEM of 6–13 values corresponding to the same number of subjects (7–13, NTg adult; 9–10, NTg old, 3xTg-AD female old; 6, 3xTg-AD male old). Each value is the mean of triplicate assays. ANOVA was followed by Tukey or Games-Howell post hoc comparisons. *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. females. F = Females; M = males.

Fig. 4. Natural killer cell activity from spleen (a) and thymus (b) lymphocytes. Each column represents the mean \pm SEM of 6–10 values corresponding to the same number of subjects (7–9, NTg adult; 9–10, NTg old, 3xTg-AD female old; 6, 3xTg-AD male old). Each value is the mean of triplicate assays. ANOVA was followed by Tukey or Games-Howell post hoc comparisons. * $p < 0.05$ vs. the corresponding gender-matched adult group; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; *** $p < 0.001$ vs. females. F = Females; M = males.

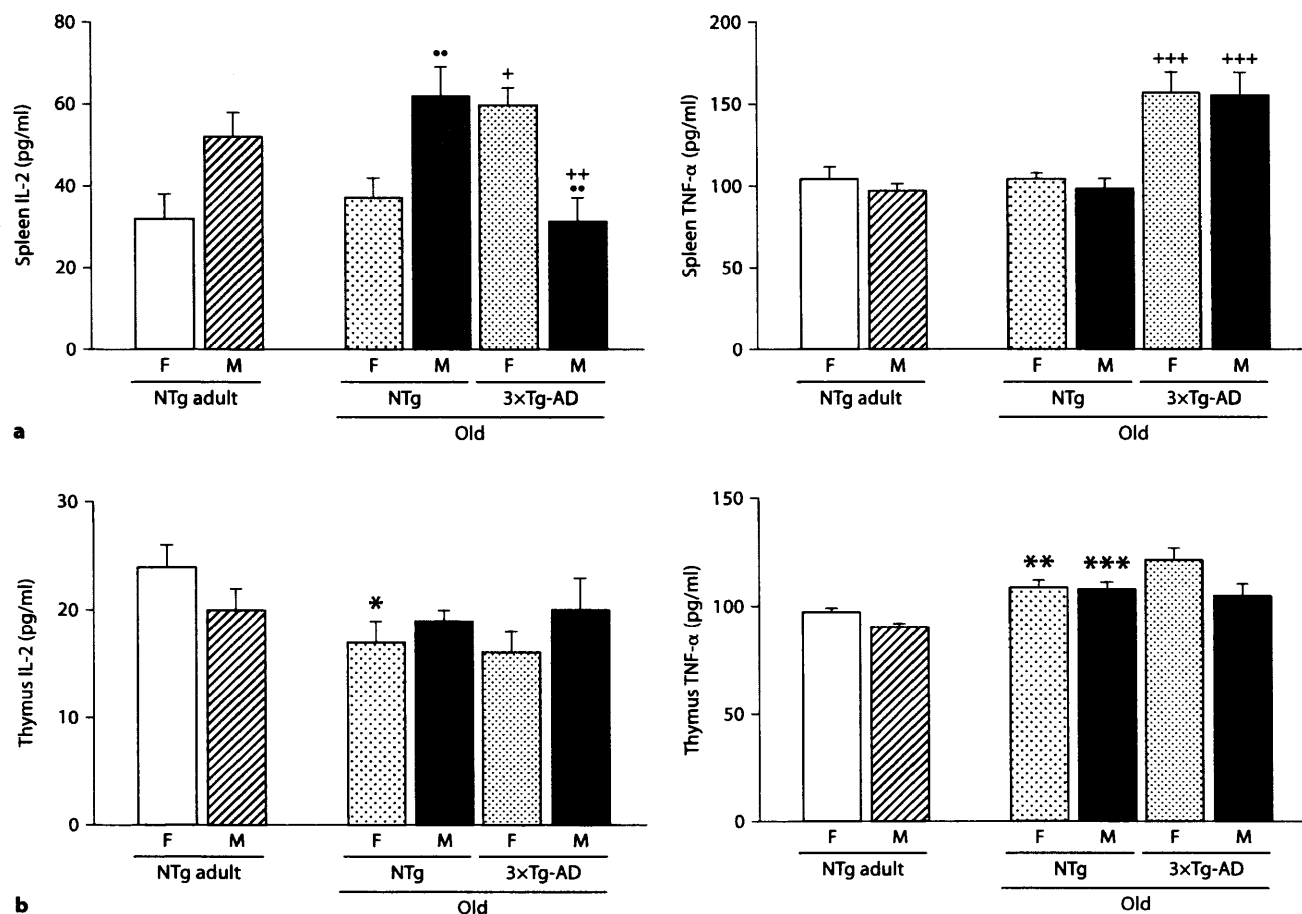


Fig. 5. IL-2 and TNF- α levels in lymphocyte culture supernatants from spleen (a) and thymus (b). Each column represents the mean \pm SEM of 6–13 values corresponding to the same number of subjects (8–13, NTg adult; 9–10, NTg old, 3 \times Tg-AD female old; 6, 3 \times Tg-AD male old). Each value is the mean of duplicate assays.

ANOVA was followed by Tukey or Games-Howell post hoc comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; ** $p < 0.01$ vs. females. F = Females; M = males.

With respect to gender differences regarding the neuroimmunoendocrine network in AD, this is a subject scarcely explored so far. Thus, no data are available as regards the peripheral immune function's gender-specific changes in AD, and both males and females have been described to show increased inflammation parameters, such as higher plasma TNF- α levels [76]. Nevertheless, male patients of AD suffer increased oxidative stress, that is, reduced glutathione concentration in red blood cells, when compared to female patients of that disease as well as to age-matched healthy controls [77]. In this context,

although we have observed a decrease in reduced glutathione levels with age in the peritoneal leukocytes of old and prematurely aging ICR (CD-1) mice [44, 78], the spleen and thymus leukocytes of 3 \times Tg-AD mice are similar to those of NTg mice (fig. 6). Nevertheless, in spleen it is possible to observe lower levels of reduced glutathione in cells from old male mice. This is in agreement with previous results on other strains of mice showing an increased oxidative state in males compared to females [79].

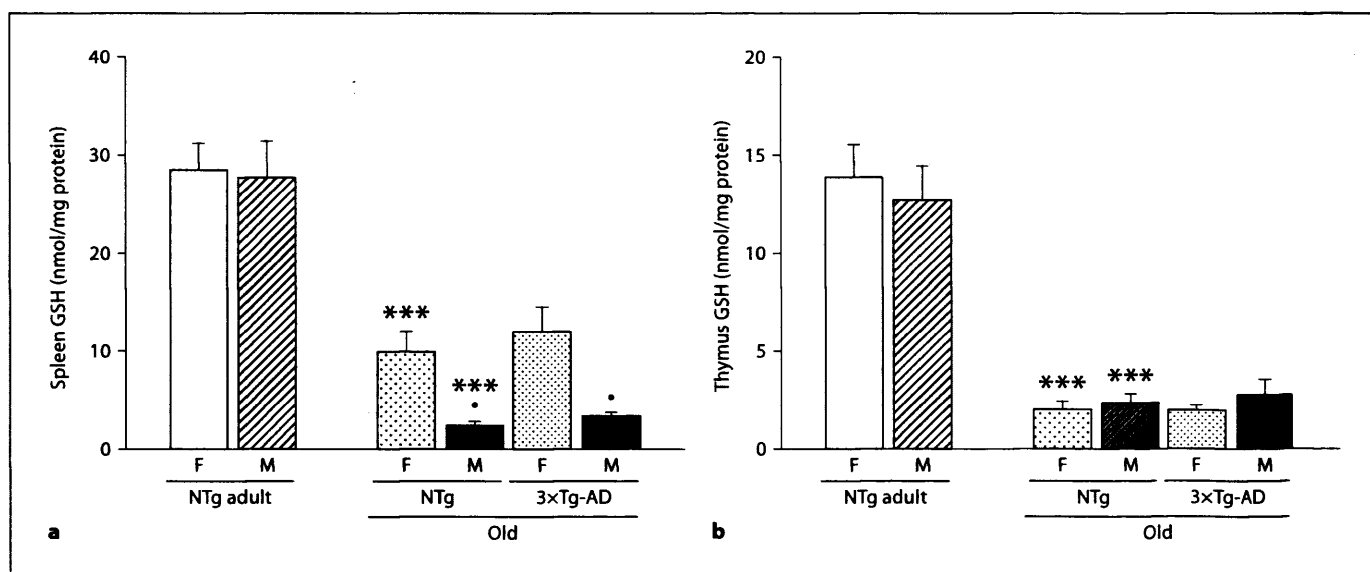


Fig. 6. Total reduced glutathione (GSH) levels in spleen (a) and thymus (b) lymphocytes. Each column represents the mean \pm SEM of 6–14 values corresponding to the same number of subjects (13–14, NTg adult; 6–10, NTg old, 3 \times Tg-AD female old; 6, 3 \times Tg-

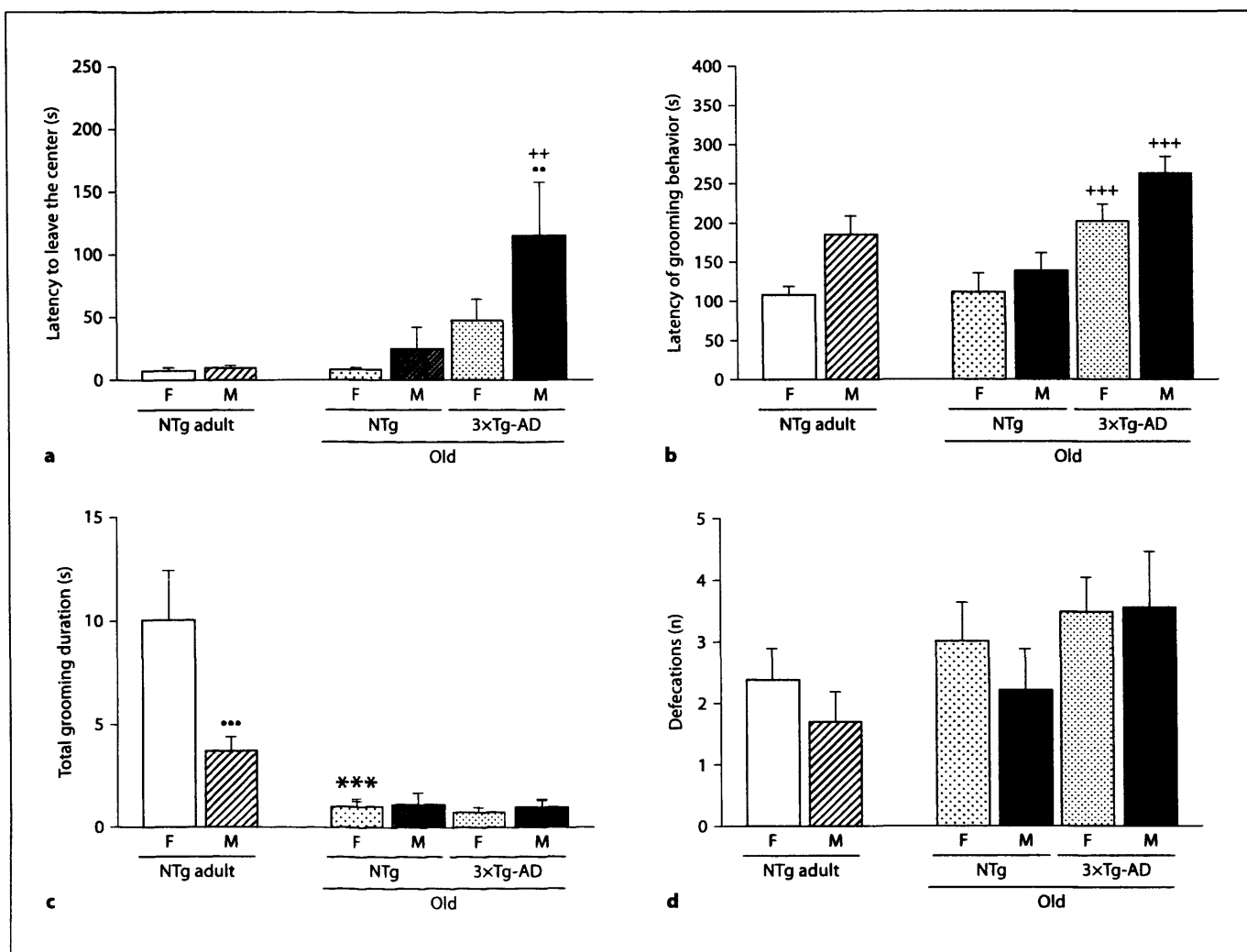
AD male old). Each value is the mean of duplicate assays. ANOVA was followed by Tukey or Games-Howell post hoc comparisons. *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; * $p < 0.05$ vs. females. F = Females; M = males.

Neuroimmunomodulation and AD: On the Role of Behavior and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. Gender Differences

The peripheral immune impairment in AD can be considered an epiphenomenon, secondary to the cerebral inflammation and the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which could lead to the mild hypercortisolemia seen in AD patients [80]. In fact, this stimulation of the HPA axis results in peripheral immunodepression [81]. Moreover, neophobia (fear of new environments) is a common feature described in many APP transgenic mice [14], and other expressions of lower ability to cope with stressors of aged transgenic mouse models for AD have been widely reported [10]. Stressful stimuli are also known to lead to increases in the HPA axis activity and the glucocorticoid cascade with the resulting hippocampus damage proposed by Sapolsky et al. [82] and immune dysfunction originally described by Selye [83] as 1 of the 3 hallmarks of the general adaptation syndrome used to define the concept of stress. In fact, dysregulation of the stress-responsive HPA axis is another feature of AD at the neuroendocrine level [84, 85]. Thus, an age- and sex-dependent hyperactivity of the HPA axis has been demonstrated in the TgCRN8 mouse model [86], and an increased sensitivity to physiological stress-

ors associated with aberrations in HPA function has also been reported in transgenic mice expressing a mutant form of human APP [87].

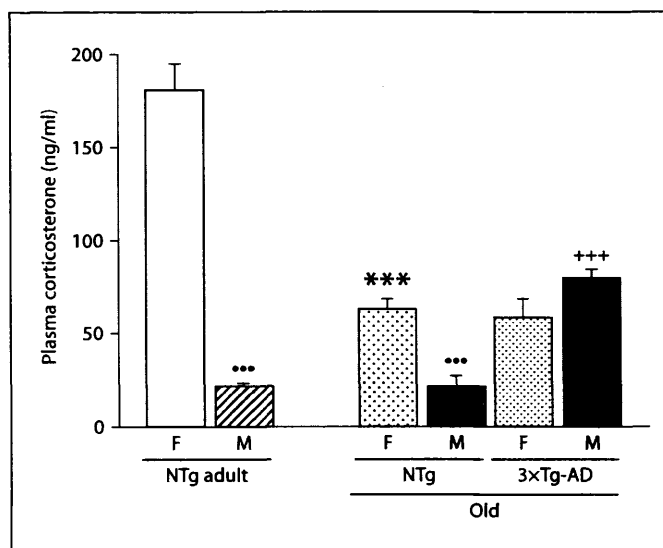
In the 3 \times Tg-AD mice, the above-mentioned lack of ability to cope with mild stressors (for example, novelty) has also been observed, mimicking some of the BPSD described in human AD patients [10, 88]. Increased emotionality and anxiety-like behaviors (increased freezing, increased latency of grooming behavior, increased defecation and urination) and neophobia to a new cage, activity disturbances (reduced initial exploratory behavior followed by reduced habituation) are clearly evident in 6-month-old adult 3 \times Tg-AD male mice. However, at this age only intracellular A β immunoreactivity and synaptic deficits are found. In fact, some of these changes (reduced initial exploratory activity, increased defecation) are already observed at younger ages (2.5 months of age) when the presence of A β is not yet reported but disruption of neuronal homeostasis may already have started [10, 88]. Previous similar results at older ages only refer to 12-month-old females [10], an age with A β extracellular plaques but not yet tau neurofibrillary tangles pathology. In the present work, we have used the open-field test and extended the study of the main anxiety-like behaviors to both genders and to 15 months of age, when both A β and tau pathologies are present. Neophobia, measured as



7

Fig. 7. Latency to leave the center (a), latency of grooming behavior (b), total grooming duration (c) and number of defecations (d). Each column represents the mean \pm SEM of 6–10 values corresponding to the same number of subjects (10, NTg adult; 10, NTg female old; 9 NTg male old; 10 3 \times Tg-AD female old; 6, 3 \times Tg-AD male old). ANOVA was followed by Tukey or Games-Howell post hoc comparisons. *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. females. F = Females; M = males.

Fig. 8. Plasma corticosterone. Each column represents the mean \pm SEM of 6–14 values corresponding to the same number of subjects (14 NTg adult; 8–10 NTg old, 3 \times Tg-AD female old; 6, 3 \times Tg-AD male old). Each value is the mean of duplicate assays. ANOVA was followed by Games-Howell post hoc comparisons. *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched adult group; *** $p < 0.001$ vs. the corresponding gender-matched NTg old group; *** $p < 0.001$ vs. females. F = Females; M = males.



8

freezing behavior (latency to leave the fear-inspiring center of the open field) is significantly higher in 3×Tg-AD old mice than in any other group (fig. 7a). Latency to initiate grooming behaviors which imply loss of control of the surrounding environment are delayed in both 3×Tg-AD old female and male mice compared to gender-matched NTg mice (fig. 7b), showing an effect of the AD transgenes. Interestingly, a reduction of the duration of the grooming behavior with aging is also observed (fig. 7c). The number of defecation boluses shows a trend to increase in 3×Tg-AD mice, albeit it did not reach statistical significance (fig. 7d).

Summing up, the behaviors exhibited by 3×Tg-AD mice (mainly in males) clearly demonstrate an increase in BPSD-like behaviors with impairment of their ability to cope with mild stressors such as the novel and open illuminated arena encountered in the test. Therefore, we were interested in assessing the levels of corticosterone in these animals. As mentioned before, cortisol/corticosterone can be inversely associated with risk-taking behaviors and the plasma concentrations of this hormone are considerably higher in adult females than in males. In agreement with this, in the present study the NTg adult females show a 6-fold increase in plasma corticosterone compared to age-matched males. The decreasing levels of cortisol with age only seen in females (whereas they are likely less dysregulated in older men compared to older women), as described in the literature, can also be observed in our study, where the sexual dimorphism is maintained with aging, although it is attenuated to a 2-fold increase (fig. 8). In addition, some authors have found similar levels of plasma cortisol in male and female patients with AD, which were increased with respect to the age-matched population [89]. In the 3×Tg-AD mice, an age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response has been observed, with young female 3×Tg-AD mice showing a markedly heightened corticosterone response after 5 days of Morris water maze training compared to age-matched male 3×Tg-AD mice, a difference no longer apparent in older mice [90]. The new results obtained in the mice of the experiment described above on the plasma corticosterone levels and presented here (fig. 8) throw some light on this phenomenon. If, in NTg mice, the gender differences are persistent with aging, with increased plasma corticosterone levels observed in females both at young and old age, as compared to age-matched males, in contrast to when AD and aging are considered together, these gender differences are no longer apparent in 3×Tg-AD mice, which is in agreement with the above-mentioned results. However, when old

3×Tg-AD mice are compared to age- and gender-matched mice, the results reveal a lack of differences between the female groups but a significant increase in plasma corticosterone in old male 3×Tg-AD mice compared to age-matched NTg mice, suggesting an enhanced HPA axis activation likely to underlie or be related to the other behavioral and immune function alterations described above in these old male 3×Tg-AD mice.

Conclusions

Impairment of the neuroimmunoendocrine network leads to loss of homeostasis and thereby contributes importantly to the progress of aging and associated neurodegenerative disorders. Besides, increasing evidence on the key role played by the immune system in the pathogenesis of AD is available. The results show that the impairment in the neuroimmunoendocrine network that occurs with aging is accelerated and more pronounced in the 3×Tg-AD mice. Although the prevalence of the disease is higher in females, the higher vulnerability of the neuroimmunoendocrine network in males could result in a higher susceptibility to deleterious effects of aging and be responsible for the increased morbidity and mortality observed in 3×Tg-AD male mice. Therefore, future research on strategies that could improve the neuroimmunoendocrine system can have promising preventive and/or therapeutical effects on the disease. The results also suggest the relevance of gender differences, which should be taken into consideration both in basic and clinical research when screening or assessing for new strategies for the control of AD.

Acknowledgements

This work was supported by EME2006-140335, SAF2006-13642, RD06/0013/0003 and the Research Group of UCM-CM (ENEROINN 910379). Thanks to G. Blázquez, T. Canete, M.M. Castillo, I. Baeza and N.M. de Castro for their skillful assistance. The animals used in the present study are from the colonies of homozygous 3×Tg-AD and wild-type NTg mice established by Lydia Giménez-Llort at the Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Institute of Neuroscience, UAB, Bellaterra, Spain from progenitors kindly provided by Prof. Frank M. LaFerla, Department of Neurobiology and Behavior, University of California Irvine, Calif., USA.

References

- DeKosky ST, Scheff SW: Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990;27:457-464.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R: Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572-580.
- Dringenberg HC: Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' - evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 2000;115:235-249.
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG: Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol* 1988;76:550-557.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mink R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salamán C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383-421.
- Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y: Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch* 2002;441:358-367.
- Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ: The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2006;113:1685-1695.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM: Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005;25:8843-8853.
- Mattson MP: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004;430:631-639.
- Giménez-Ilort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson BI, Oddo S, Toboña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A: Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:125-147.
- Selkoe DJ: Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann NY Acad Sci* 2000;924:17-25.
- Bartus RT: On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 2000;163:495-529.
- Lai F, Williams RS: A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Archives Neurol* 1989;46:849-853.
- Janus C, Westaway D: Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2001;73:873-886.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM: Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neurone* 2003;39:409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM: Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM: Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3046-3051.
- Billings L, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM: Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neurone* 2005;45:675-688.
- Fabris N: A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci* 1990;51:373-375.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL: Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, 2001, pp 241-286.
- De la Fuente M, Medina S: NPY and phagocytic cell functions; in Zukowska Z, Feuerstein GZ (eds): *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. Basel, Birkhäuser Verlag, 2005, pp 107-122.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo, MC: The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1356-1366.
- Merrill JE: Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, 2001, pp 547-561.
- De la Fuente M, Del Rio M, Medina S: Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001;116:156-167.
- Puerto M, Guaybas N, Alvarez P, De la Fuente M: Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005;165:33-40.
- Rosenblitt JC, Soler H, Johnson SE, Quadagno DM: Sensation seeking and hormones in men and women: exploring the link. *Horm Behav* 2001;40:396-402.
- Kraemer S: The fragile male. *BMJ* 2000;321:1609-1612.
- Owens IP: Ecology and evolution: sex differences in mortality rate. *Science* 2002;297:2008-2009.
- Mazur A: Biosocial models of deviant behavior among male army veterans. *Biol Psychol* 1995;41:271-293.
- Atkinson HC, Waddell BJ: Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 1997;138:3842-3848.
- Stefanski V, Grüner S: Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain Behav Immun* 2006;20:369-377.
- Burgess LH, Handa RJ: Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 1992;131:1261-1269.
- Zietz B, Hrach S, Schölmerich J, Straub RH: Differential age-related changes of hypothalamus-pituitary-adrenal axis hormones in healthy women and men: role of interleukin 6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:93-101.
- Walston J, Fried LP: Frailty and the older man. *Med Clin North Am* 1999;83:1173-1194.
- Wilkinson CW, Petrie EC, Murray SR, Colasurdo EA, Raskind MA, Peskind ER: Human glucocorticoid feedback inhibition is reduced in older individuals: evening study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:545-550.
- Landfield PW, Blalock EM, Chen KC, Porter NM: A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: Implications for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007;4:205-212.
- Aspinall R: Longevity and the immune response. *Biogerontology* 2000;1:273-278.
- Weinstein Y, Ran S, Segal S: Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 1984;132:656-661.

- 39 De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF: Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 2004;5:389–400.
- 40 Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y: The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 2001;50:41–55.
- 41 Borrás C, Gambini J, Viña J: Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci* 2007;12:1008–1013.
- 42 Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M: Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol* 2004;50:OL677–OL681.
- 43 De la Fuente M: The immune system as a marker of health and longevity. *Antiaging Medicine* 2004;1:31–41.
- 44 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, Alvarado C: Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004b;50:OL683–OL690.
- 45 Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancis J, Zehr C, Daeschner JM, Olschowka JA, Fonseca MI, O'Banion MK, Tenner AJ, Lemere CA, Duff K: Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2001;158:1345–1354.
- 46 Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F: β -Amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 2002;11:257–274.
- 47 Streit WJ: Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002;40:133–139.
- 48 Grammas P, Ovase R: Cerebrovascular transforming growth factor- β contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 2002;160:1583–1587.
- 49 Mrak RE, Sheng JGW, Griffin ST: Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenetic implications. *Hum Pathol* 1995;26:816–823.
- 50 Hüll M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J: Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1996;246:124–128.
- 51 Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A: Intracerebral production of tumour necrosis factor- α , a local neuroprotective agent in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Clin Immunol* 1999;19:223–230.
- 52 Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K: Decline of immune responsiveness: A pathogenic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res* 2005;39:535–543.
- 53 Remarque EJ, Bollen ELEM, Weverling-Rijnsburger AWE, Laterveer JC, Blauw GJ, Westendorp RGJ: Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. *Exp Gerontol* 2001;36:171–176.
- 54 Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R: Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 2002;40:260–269.
- 55 Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC: Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994;44:227–232.
- 56 Cirrito JR, Holtzman DM: Amyloid β and Alzheimer's disease therapeutics: the devil may be in the details. *J Clin Invest* 2003;112:321–323.
- 57 McKee AC, Carreras J, Hossain L, Ryu H, Klein WL, Oddo S, LaFerla FM, Jenkins BG, Kowall NW, Dedeoglu A: Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res* 2008;1207:225–236.
- 58 Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R: A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;45:666–668.
- 59 Nicoll JAR, Mrak RE, Graham DJ, Steward J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WST: Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000;47:365–368.
- 60 Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M: Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1 α gene polymorphism. *Ann Neurol* 2000;47:361–365.
- 61 Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM: Amyloid β -peptide: the inside story. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:231–239.
- 62 Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173–177.
- 63 Lemere CA, Spooner ET, LaFrancis J, et al: Evidence for peripheral clearance of cerebral A β protein following chronic, active A β immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis* 2003;14:10–18.
- 64 DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D: Intrahippocampal LPS injections reduce A β load in APP and PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2001;22:1007–1012.
- 65 Quinn J, Montine T, Morrow J, Woodward WR, Kulhanek D, Eckenstein F: Inflammation and cerebral amyloidosis are disconnected in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2003;137:32–41.
- 66 Linton PJ, Dorshkind K: Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5:133–139.
- 67 Pawelec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C: Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. *Trends Immunol* 2002;23:330–332.
- 68 Lloberas J, Celada A: Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 2002;37:1325–1331.
- 69 De la Fuente M: Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S5–S8.
- 70 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F: Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008;42:272–280.
- 71 Medina S, Del Rio M, Victor VM, Hernanz A, De la Fuente M: Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8s, GRP and NPY. *Mech Ageing Dev* 1998;102:249–261.
- 72 Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M: Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675–685.
- 73 Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS: Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:M45–M48.
- 74 Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:249–256.
- 75 Guayerbas N, De La Fuente M: An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339–350.
- 76 Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S: Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol* 2008;193:183–187.
- 77 Liu H, Harrell LE, Shenvi S, Hagen T, Liu LM: Gender differences in glutathione metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2005;79:861–867.
- 78 Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausseres N, Jimenez L, De la Fuente M: Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006;22:767–777.
- 79 Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M: A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:157–162.

- 80 Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I: Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging* 1997;18:285-289.
- 81 Woiciechowsky C, Schoning B, Lanksch W-R, Volk H-D, Docke W-D: Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med* 1999;77:769-780.
- 82 Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS: The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 1986;7:284-301.
- 83 Selye H: The stress of life: revised edition. New York, McGraw Hill Book Co., 1975.
- 84 Maeda K, Tanimoto K, Terada T, Shintani T, Kakigi T: Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. *Neurobiol Aging* 1991;12:161-163.
- 85 Hatzinger M, Z'Brun A, Hemmeter U, Seifritz E, Baumann F, Holsboer-Tachsler E, Heuser IJ: Hypothalamic-pituitary-adrenal system function in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1995;16:205-209.
- 86 Touma C, Ambree O, Gortz N, Keyvani K, Lewejohann L, Palme R, Paulus W, Schwarze-Eicker K, Sachser N: Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:893-904.
- 87 Pedersen WA, Culmsee C, Ziegler D, Herman JP, Mattson MP: Aberrant stress response associated with severe hypoglycemia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 1999;13:159-165.
- 88 Gimenez-Llort L, Blázquez G, Canete T, Rosa R, Vivo M, Oddo S, Navarro X, Lamerla FM, Johansson B, Tobena A, Fernandez-Teruel A: Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's dementia in 3xTg-AD mice; in Iqbal K, Winblad B, Avila J (eds): *Alzheimer's Disease: New Advances*. Bologna, Medimond S.r.l., 2006, pp 513-516.
- 89 Rasmuson S, Näsman B, Carlström K, Olsson T: Increased levels of adrenocortical and gonadal hormones in mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002;13:74-79.
- 90 Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM: Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007;28:76-82.

Impaired Immune Function in a Homeless Population with Stress-Related Disorders

Lorena Arranz^a Aída de Vicente^b Manuel Muñoz^b Mónica De la Fuente^a^aDepartment of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, and ^bDepartment of Personality, Evaluation and Psychological Treatment, Faculty of Psychology, Madrid Complutense University, Madrid, Spain

Key Words

Homelessness · Stress-related disorders ·
Psychoimmunology · Immune functions · Cytokines ·
Total antioxidant levels · Cortisol

Abstract

Objective: Homeless people suffer high levels of psychological distress. The aim of the present work was to study the immune function in a group of homeless people with stress-related disorders and compare it with that of healthy non-homeless controls. **Methods:** We included in the study 40 homeless persons and 40 housed controls recruited from the population of Madrid and matched for age and gender. Samples from peripheral blood were collected and we studied several leukocyte functions previously described as good health and survival markers [adherence, chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion levels, lymphocyte proliferation in response to phytohemagglutinin, NK activity and cytokine (IL-2, TNF- α) levels], as well as other related parameters, such as plasma cortisol levels and total antioxidant capacity. **Results:** There was a strongly suppressed immune response in the homeless group, with decreased adherence, chemotaxis, phagocytosis, superoxide levels, lymphoproliferation and NK activity. IL-2 and plasma antioxidant levels were also impaired. **Conclusions:** These findings suggest an altered immune function in the homeless population that

might be responsible for the higher morbidity and mortality of homeless people. In addition, the present work points out directions for future research attempting to increase the quality of life and health status of homeless individuals, since it shows that oxidative stress seems to play a key role in this immune function impairment.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Introduction

Homelessness has emerged as a major social problem in present societies, and several studies have indicated a great increase in the homeless population over the past 2 decades [1]. Living on the streets is often associated with illness, psychological stress, increased alcohol intake, higher mortality rates and lower life expectancy than in the general population [2]. The National Health Care for the Homeless Council [3] showed clearly a worrisome picture and emphasized the need to pay more attention to health investigation, diagnosis, and treatment of this population.

Homelessness can be stressful for a great number of reasons. Homelessness is characterized by extreme poverty and marginalization, and is aggravated by experiences of social isolation or disaffiliation [4]. The existing body of literature points to the homeless population as a

group that is probably exposed to victimization, childhood histories of economic and social disadvantage and a lack of social networks [5, 6]. They are often subjected to massive stress because of the experience of homelessness itself; living in over-crowded conditions, increased exposure to violence, loneliness and struggling with financial burdens [7]. In view of the above, it is not surprising that homelessness is considered the most extreme form of social exclusion [8].

People who are homeless face an increased risk of mental health problems [9, 10]. A number of studies have documented the high levels of psychological distress experienced by homeless people [11]. Compared to the general population, these people suffer higher levels of anxiety and depression, and experience more stressful life events over their lifetimes [6, 12].

Homeless people are also more susceptible to medical problems [7]. Infectious diseases, which are directly related to immunological functioning, are a particularly serious problem among the homeless [13]. The prevalence of viral and bacterial infections, such as hepatitis B and C, HIV, pneumonia, tuberculosis, positive tuberculin skin tests, respiratory infections and outbreaks of other aerosol-transmitted infections, diphtheria, skin infections and sexually transmitted diseases, has been well established [13–15]. Another serious medical problem among the homeless is cancer. Some studies have reported an increased incidence of cancer risk factors among this population [16], and cancer has been considered the major cause of death among homeless people who were between 45 and 64 years old [2]. Taken together, these studies offer substantial evidence of the deleterious effects of homelessness on overall psychological and physical health.

In the context of psychoneuroimmunology, it is known that behavior and stress can modify the complex interactions between the central nervous system and the immune system [17], and several studies have shown the suppressive effect of chronic stress, depression, and anxiety on immune functions [18]. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis is the neuroendocrine system of greatest specific interest in the study of stress and health, with cortisol being the principal glucocorticoid that modulates emotions, especially fear and anxiety [19, 20]. Leukocytes exhibit receptors for many neuroendocrine products, such as those from the HPA axis [21]. Thus, cortisol can cause changes in immune cell trafficking, proliferation, cytokine secretion, antibody production and cytolytic activity [22, 23].

In an experimental study about social exclusion, Pressman et al. [24] found that loneliness was associated with poorer antibody response and elevations in circulating levels of cortisol. In another study, Eisenberger et al. [25] examined the neural correlates of social exclusion in the general population by neuroimaging techniques. They found that the distress of social exclusion activates brain areas similar to those activated during physical pain. Both experimental studies indicate that social exclusion can produce neurocognitive and immunological effects. Nevertheless, there are few field studies on this topic, and the immunological consequences of this situation have received relatively little attention. In addition, it is necessary to consider the multifaceted elements of homelessness and social exclusion, which could lead to not entirely equivalent physiological consequences [26].

Despite the relative abundance of health research on homelessness, few original studies attempting to evaluate the biological consequences of this phenomenon have been conducted. Schleifer et al. [27] studied a set of immune parameters in people addicted to alcohol, mainly homeless, and Capo et al. [28] analyzed the immune response of a group of homeless people with *Bartonella quintana* bacteremia. Some authors have suggested the existence of an altered immunity that could explain the higher susceptibility of homeless people to infections, but this hypothesis has not yet been tested [29]. Therefore, studies of a wide range of immunological factors in the homeless population are needed.

The aim of this work was to examine a battery of *in vivo* immune functions in homeless subjects and compare them with those of age- and gender-matched controls drawn from the general housed population [30]. The immune function of leukocytes has been described as a good health and survival marker [31, 32], which has been demonstrated specifically in the cases of adherence [33], chemotaxis [34], phagocytosis, superoxide anion levels [35], lymphoproliferation and IL-2 [36], NK activity [37] and TNF- α levels [38]; the parameters investigated in the present study. Plasma cortisol was also determined for the above-mentioned reasons. Finally, as adequate amounts of antioxidants are required to prevent cellular damage, especially in immune cells [39], we also studied the plasma total antioxidant capacity. Research comparing a group of homeless individuals with a matched group of housed subjects will help us continue to learn about the association between homelessness and immune function, and so will also help us to develop efficient strategies to improve the quality of life of the homeless population.

Materials and Methods

Setting

The city of Madrid, Spain, has a population of approximately 3 million people. Over a 1-year period, between 5,000 and 7,000 people are really homeless and/or use services for the homeless [12].

Participants

This study included 80 persons ranging in age from 18 to 67 years at the time of the baseline interview. The sample consisted of homeless people ($n = 40$) and a comparison group ($n = 40$) of people matched for age and gender who were not homeless (housed sample).

The homeless sample was recruited at a day center/soup kitchen for homeless people that approximately 400 people attend daily. The inclusion criteria were: (1) being a user of the center at the time of the study, and (2) being 18 years or older. The exclusion criteria were: (1) previous psychiatric diagnosis of schizophrenia, psychosis, or dementia; (2) previous diagnosis of HIV infection; (3) active alcohol/drug abuse [stated by potential participants and confirmed by salivary detection (DRE, Spain)]; (4) inability to complete the evaluation protocol; (5) use of current medication that could interfere with the immunological results, and (6) inability to speak, read or write in Spanish.

A sample of 90 individuals was randomly selected from the entire list of users of the day center (360 users), by a systematic random sampling procedure. Thirty-two users were missing at the time of the study. From a total of 58 persons approached, 6 (10.3%) were excluded because of the above criteria and 12 (20.7%) refused to participate. Thus, 40 participants were finally included.

For the control group, 40 volunteers were evaluated. These participants were people who responded to e-mail advertisements and posters. The subjects were matched to the homeless sample for age and gender. The inclusion criterion was having an adequate dwelling (or space) over which the person and his/her family could exercise exclusive possession (housed sample). Exclusion criteria were the same as for the experimental group.

All participants (both the homeless and housed samples) received information about the purpose of the study and they gave their written consent for their blood samples to be used for academic research. Informed consent was sought after the interview was over and before potential participants were asked to give blood. Blood samples (drawn by venipuncture from peripheral blood) were collected from 10:00 to 14:00 h in tubes with citrate (BD Vacutainer Systems). This study was approved by the ethical committee of the School of Psychology at the Complutense University of Madrid and was in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki. Both tests and interviews were conducted in a private room.

Because of technical reasons, measurements of cortisol ($n = 34$), plasma antioxidants ($n = 56$) and cytokines ($n = 22$) could not be performed in all the samples from both experimental groups. The remaining variables were measured in all subjects from the homeless and housed groups ($n = 80$). Samples were matched for age and gender in all cases.

Instruments

A structured interview was developed that included data about sociodemographic characteristics, stressful life events, psychosocial factors, cognitive functioning and quality of life aspects. The

information about depressive and anxious symptoms was gathered using the Beck Depression Inventory [40] and the Beck Anxiety Inventory [41], respectively. The Beck Depression Inventory consists of 21 questions that evaluate depressive symptoms over the previous week, rating each from 0 (absent) to 3 (very intense). It has a test-retest reliability of $r = 0.81$ and internal consistency between 0.73 and 0.95 [42, 43]. The Beck Anxiety Inventory is a 21-item scale assessing anxiety over the previous week, with $\alpha = 0.90$ and test-retest $r = 0.67$ – 0.93 [44].

Immune System Measurements

Adherence Capacity

For adherence capacity measurement, the method described by De la Fuente et al. [45] was used. The results were expressed as Adherence Index, which is $[(\text{initial cells/ml} - \text{effluent cells/ml}) / (\text{initial cells/ml})] \times 100$.

TNF- α Levels

TNF- α was measured on culture supernatants of total blood in the presence of lipopolysaccharide, following a method previously described [46]. TNF- α level was determined using an ELISA kit (Diacor Research, Besançon, France), with a minimum detectable dose of TNF- α of less than 10 pg/ml. The results were expressed in pg/ml.

Separation of Neutrophils and Lymphocytes

Cells were obtained following a method previously described [47]. Collected cells, containing 98% neutrophils or lymphocytes, were diluted to the corresponding final concentrations for the development of each assay.

Phagocytosis

The phagocytosis assay was carried out following the method described by De la Fuente et al. [45]. The number of particles ingested by 100 neutrophils is expressed as the phagocytic index, while the number of ingesting neutrophils per 100 neutrophils is expressed as the phagocytic efficiency.

Superoxide Anion Levels

The superoxide anion was evaluated following the method described by De la Fuente et al. [48]. Briefly, aliquots of neutrophil suspension were mixed with nitroblue tetrazolium and latex bead suspension (stimulated samples) or PBS (non-stimulated samples). The reduced nitroblue tetrazolium was determined by spectrophotometry and the results were expressed as nmol/ 10^6 cells.

Lymphoproliferation

A previously described method was used [47, 48]. Briefly, aliquots of 200 μ l lymphocyte suspension (10^6 cells/ml complete medium, containing 1640 RPMI with phenol red, supplemented with 1% gentamicin, 1 mg/ml and 10% fetal calf serum previously heat-inactivated, were dispensed in 96-well plates and 20 μ l/well of phytohemagglutinin (PHA) at 25 μ g/ml were added. After 48 h of incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 2.5 μ Ci ³H-thymidine were added to each well, followed by another incubation of 24 h. Cells were harvested in a semiautomatic microharvester and thymidine uptake was measured in a β counter for 1 min. The results were expressed as ³H-thymidine uptake (c.p.m.).

IL-2 Levels

The level of IL-2 was determined in supernatants of lymphocyte cultures in the presence of PHA (25 µg/ml), following a method previously described [48]. IL-2 was measured using an ELISA kit (Diacclone Research, Besançon, France), with a minimum detectable dose of IL-2 of less than 10 pg/ml. The results were expressed in pg/ml.

Cytotoxicity

For target-cell cytotoxicity measurement, an enzymatic colorimetric assay was used (CytoTox 96®; Promega, Boehringer Ingelheim) [48, 49]. Human tumoral K562 cells were used as the target in the NK assay. Cells were maintained in complete medium. Target cells were seeded in 96-well U bottom culture plates at 10⁴ cells/well in 1640 RPMI without phenol red. Effector cells (mononuclear leukocytes) were added at 10⁵ cells/well. The effector/target rate was 10/1. To determine the percentage of lysis of target cells, the following equation was used: % lysis = $[(E - ES - TS)/(M - TS)] \times 100$, where *E* is the mean of absorbances in the presence of effector and target cells, *ES* is the mean of absorbances of effector cells incubated alone, *TS* is the mean of absorbances in target cells and *M* is the mean of maximum absorbances after incubating target cells with lysis solution.

Plasma Measurements

Plasma Cortisol

Plasma cortisol levels were determined using a competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination (Biolink, Barcelona, Spain). The inter- and intra-run precision had a coefficient of variation of 3.2 and 5.8%, respectively. The values were expressed in ng/ml.

Plasma Total Antioxidant Capacity

Antioxidant levels in plasma samples were evaluated with a kit provided by Deltaclon (Madrid, Spain). The inter- and intra-run test precision had a coefficient of variation of 2.2 and 4.2%, respectively. The results were expressed as units of total antioxidant capacity (unit/ml plasma). One unit of total anti-oxidative capacity is defined as the increase in the absorbance value of the reaction system in 0.01 per min in each milliliter of plasma at 37°C.

Statistical Analyses

The results are given as means \pm SEM. Since the data were normally distributed (as shown by the Kolmogorov-Smirnov test), the differences between the homeless and the control group were assessed by the Student's *t* test for unrelated samples. *p* < 0.05 was considered significant.

Results

Sociodemographic and Psychological Data

Of the 40 participants finally included in the homeless group, 28 (70%) were men and 12 (30%) were women. We investigated the possible effects of gender on the variables under study, and in general, found it had no significant affect on the parameters studied. However, women had

significantly (*p* < 0.05) higher values than men for chemotaxis of neutrophils (chemotaxis index: mean 552, SD 254 vs. mean 441, SD 213) and cortisol (mean 25, SD 14 ng/ml vs. mean 16, SD 9 ng/ml). The interaction between gender and group was not significant in any of the measurements included in this study.

The mean age was 43 years (SD 11.58). Most of the participants had some college education (*n* = 39, 98.5%). 31 (72%) participants had been homeless (defined as living outdoors, in temporary shelters and hostels for homeless people, in institutions or temporarily with relatives or friends due to lack of housing) for an average of 5.28 months (SD 5.96). The remaining participants of this group (*n* = 9, 28%) were inadequately housed people (those in housing close to the minimum standards). All participants had suffered a wide range of stressful life events (e.g. unemployment, deaths in their families, health problems, violence).

Regarding the perception of their current health status, more than half of the sample (62.6%) reported they had serious or regular health problems. 53.1% of the sample reported some physical problem such as respiratory infections (17.4%), herpes simplex (13%), headache and muscular and bone pain (17.4%).

Most participants reported clinical levels of psychological distress. The average score in depression, assessed by the Beck Depression Inventory, was 18.03 (SD 11.17), and in anxiety, assessed by the Beck Anxiety Inventory, was 17.34 (SD 11.31). 75% of the sample showed clinical levels of depression and 65.6% showed clinical levels of anxiety. With regard to the housed subjects, their average scores for both depression (Beck Depression Inventory 5.9, SD 5.4) and anxiety (Beck Anxiety Inventory 9.56, SD 7.85) were at the normal levels of the general population.

Neutrophils

The results on neutrophils are shown in figure 1. Adherence (fig. 1a) and chemotaxis indexes (fig. 1b), phagocytic capacity [measured as number of particles phagocytosed by 100 neutrophils (phagocytic index), fig. 1c] and percentage of ingesting neutrophils (phagocytic efficiency, fig. 1d), as well as superoxide anion levels (fig. 1e) in nonstimulated and stimulated samples, were impaired in homeless people (*p* < 0.001) as compared to their housed counterparts.

Lymphocytes

Figure 2 shows the results on lymphocyte functions. Student's *t* test revealed statistically significant differences

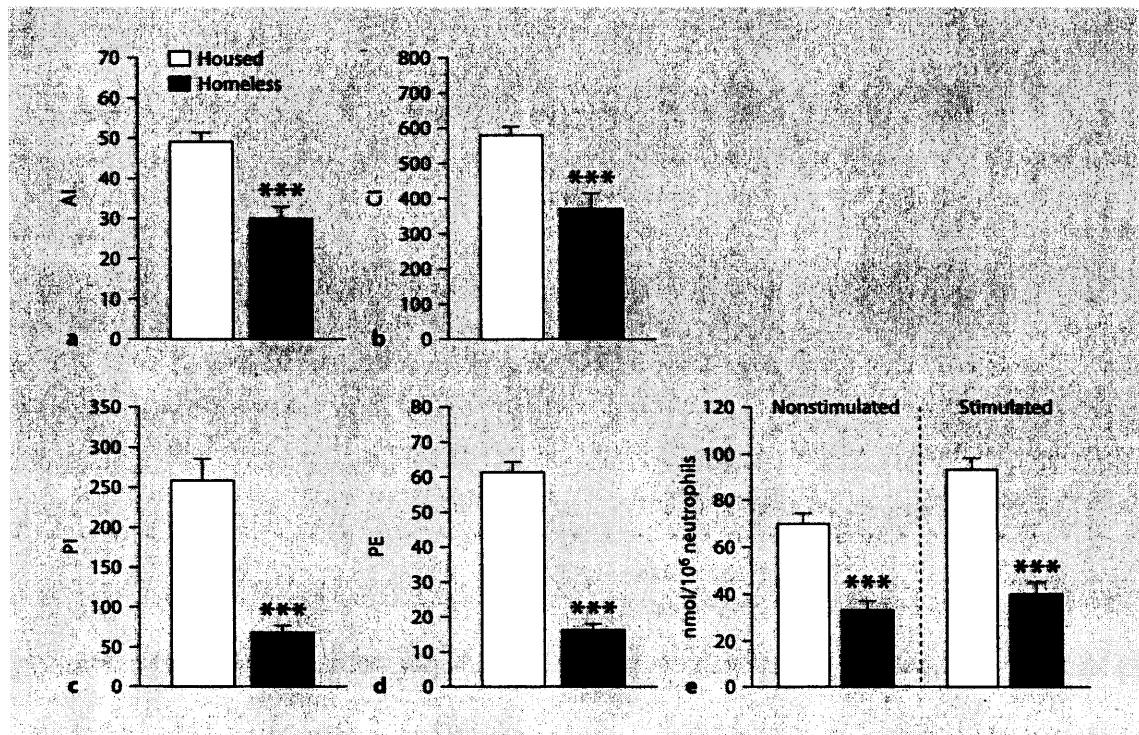


Fig. 1. Neutrophil adherence (a), neutrophil chemotaxis (b), neutrophil phagocytosis (c, d) and superoxide anion levels (e) in non-stimulated and stimulated samples of human peripheral blood neutrophils from homeless people and housed controls matched for gender and age. Each column represents the mean \pm SEM of 40 subjects, each value being the mean of duplicate assays. AI = Adherence index; CI = chemotaxis index; PI = phagocytic index; PE = phagocytic efficiency (see Materials and Methods for details). *** $p < 0.001$ with respect to the value in the control group.

es ($p < 0.001$) between both groups, being lower in the homeless population than in the housed controls for all cell functions studied: adherence (fig. 2a) and chemotaxis indexes (fig. 2b), lymphoproliferative response to PHA (fig. 2c) and NK activity (fig. 2d).

Cytokines

IL-2 levels (fig. 3a) in lymphocyte culture supernatants were decreased ($p < 0.001$) in the homeless with respect to housed controls, whereas the levels of TNF- α (fig. 3b), measured on culture supernatants of total blood in the presence of lipopolysaccharide, appeared to be similar in both experimental groups studied.

Plasma Measurements

Plasma cortisol levels were similar in both homeless and housed groups (fig. 4a). Regarding plasma total antioxidant capacity (fig. 4b), homeless people showed a decrease in this capacity when compared to housed controls ($p < 0.05$).

Discussion

Despite the high prevalence of health problems in the homeless population, most of them related to the immune system functioning, this system has received relatively little attention. Some authors have already suggested that an altered immunity affects these individuals [29]. However, the present work is, to our knowledge, the first to compare several immune parameters (described to be good health and survival markers [33–39]) in the homeless subjects and housed controls. Our results demonstrate a strongly suppressed immune response in homeless people as compared to gender- and age-matched housed controls, at least in the following parameters: adherence to tissues of both neutrophils and lymphocytes, neutrophil phagocytosis and superoxide anion levels, lymphoproliferation in response to mitogens of T lymphocytes, IL-2 levels in those culture supernatants, and NK activity. Plasma total antioxidant capacity was also impaired in the homeless individuals.

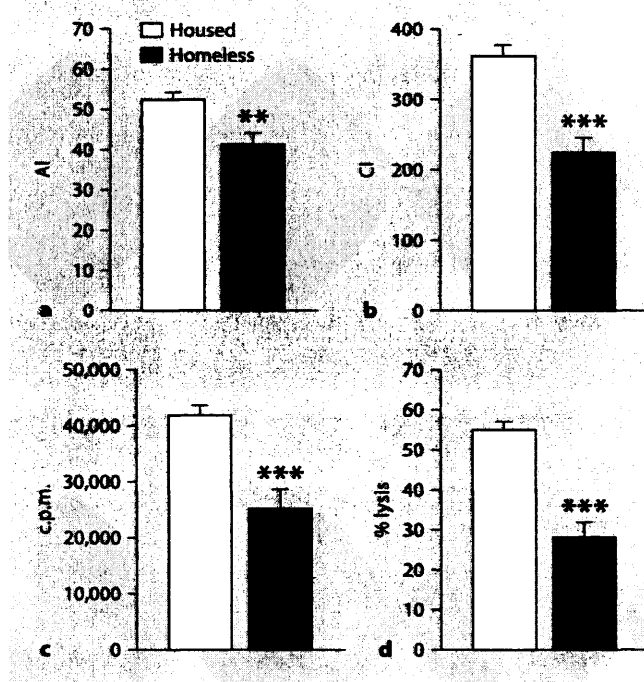


Fig. 2. Lymphocyte adherence (a), lymphocyte chemotaxis (b), lymphoproliferation in response to PHA (c), and NK activity (d) of human peripheral blood lymphocytes from homeless people and housed controls matched for gender and age. Each column represents the mean \pm SEM of 40 subjects, each value being the mean of duplicate or triplicate assays. AI = Adherence index; CI = chemotaxis index (see Materials and Methods for details). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, with respect to the value in the control group.

Immune cell adherence has been a function scarcely studied as regards psychoneuroimmunology. Either increases or no changes in this function have been found in mouse and human models of anxiety [50–52]. Indeed, the very low adherence of the immune cells from the homeless in comparison with those of housed controls may show a poorer function. Thus, cells would be more unlikely to roll on the surface of endothelial cells, perform integrin-mediated adhesion to them and migrate through the endothelial layer. In addition to this, chemotaxis of immune cells to the source of bacterial infection appears to be deteriorated in the homeless population. These results agree with those found by us and other authors on the response to anxiety in human and mouse models [34, 51–53]. This, however, contrasts with the situation in depressed patients, who have previously been reported to show normal neutrophil chemotaxis [54].

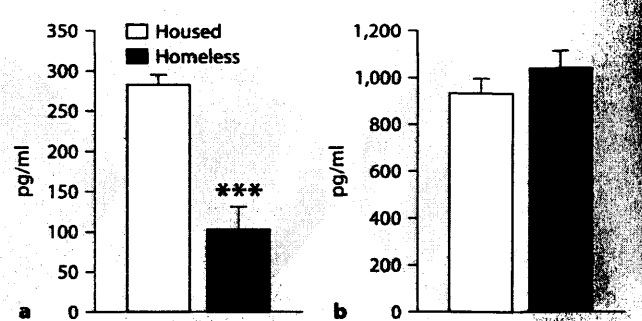


Fig. 3. IL-2 levels in lymphocyte culture supernatants of human peripheral blood lymphocytes (a) and TNF- α levels in total blood culture supernatants (b) from homeless people and housed controls matched for gender and age. Each column represents the mean \pm SEM of 11 subjects, each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$ with respect to the value in the control group.

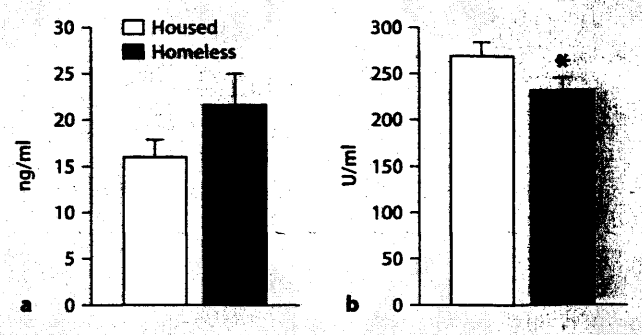


Fig. 4. Plasma cortisol levels (a) and total antioxidant capacity (b) in homeless people and housed controls matched for gender and age. Each column represents the mean \pm SEM of 17 (a) and 28 (b) subjects, each value being the mean of duplicate assays. * $p < 0.05$ with respect to the value in the control group.

With respect to phagocytic capacity, a strong functional decline is observed in homeless individuals. Similar findings have been reported in depressed patients [55], although some authors did not find any changes [54]. Studies on mouse and human models of anxiety have also shown a diminished phagocytic function [34, 51, 52]. Killing of bacteria by intracellular oxygen radicals, such as superoxide anion, also seems to be a depressed function in homeless people as compared to the housed population. This suggests that phagocytic cells from homeless individuals are defective in their ability to generate reac-

tive oxygen intermediates, thus making homeless people more vulnerable to bacterial infections. However, Maes et al. [54] did not find such changes in depressed patients, whereas previous studies by our research group showed increased superoxide anion levels in anxious individuals [52]. Therefore, neutrophils could be involved in the increased susceptibility to physical illnesses, such as bacterial infections, of homeless people.

Lymphocyte proliferative response in the homeless population shows a markedly reduced response to PHA. Several studies on chronic stress, depression disorders, anxiety and loneliness have found that they are strongly related to a reduced PHA-induced lymphocyte proliferative response [52, 56, 57]. Therefore, these psychological conditions could contribute importantly to the impaired T lymphoproliferative function in homeless subjects. This finding suggests a reduced cell-mediated immune function in the homeless population. Together with their greater exposure to disease-causing agents [58] and higher-risk behaviors [16], this weakened immune response could be a reason for the increased burden of infectious diseases borne by homeless people.

As regards NK activity, our results indicate a suppression of this function in the homeless population. We and other authors have reported a reduction of NK cytotoxicity in anxiety and depressive disorders [52, 59]. Furthermore, loneliness, which is a condition related to depression, also seems to lead to inhibition of this function [56]. Thus, the higher prevalence of cancer and viral infections among the homeless, as compared to the housed population, may not only be due to increased risk behaviors [16] but also to diminished immunosurveillance.

One possible mechanism linking homelessness to poorer immune response is the oxidative stress pathways. Plasma total antioxidant capacity, which is a good marker of oxidative stress, is decreased in homeless subjects, reflecting a deficiency in their ability to rapidly handle an increase in reactive oxygen species, which would compromise cell functions. Similar results have previously been reported in anxious patients [52]. Oxidative stress may damage biologically important macromolecules, such as membrane lipids, which are particularly susceptible to peroxidation, resulting in an altered membrane fluidity and cell membrane-related function, including chemotaxis and phagocytosis [60]. Consistent with these data, as mentioned above, the immune cells of homeless subjects show an impaired ability to migrate to the site of infection and the phagocytic capacity of neutrophils is also reduced. Higher oxidative stress has also been related to suppression of the production of some cytokines,

such as IL-2 [61], which is an important stimulus for lymphoproliferative responses and NK activity [62]. According to this, we found that the homeless group shows lower IL-2 levels, markedly reduced lymphocyte proliferative responses to PHA and significantly diminished NK cell activity; all congruent with previous observations in anxious women [52].

Although, as has been discussed, homelessness, anxiety and depression share some of their main effects on the immune system, homelessness seems to add certain traits to the whole picture. The homeless people studied in the present work indeed suffered anxiety and depression, but it must be considered that, through feelings of distress and negative affect, social isolation could be contributing importantly to the differences in the immune function changes observed in homeless people as compared to those shown by housed people suffering anxiety and depression in other studies [63]. In addition, living on the streets or in inadequate shelters is a source of stress by itself, because it is related to crowded living conditions, exposure to the elements, limited hygiene and daily episodes of violence [25, 63]. Several studies have found that homeless subjects are more likely to have health habits that put them at greater risk, including poorer sleep, a greater propensity for alcohol and drug abuse, poorer nutrition and less exercise, and that these behaviors have immunological consequences [64]. The homeless people studied in the present work were fed healthy diets, which provided optimum nutrition, in the day center/soup kitchen from which they were recruited. Therefore, nutrition is unlikely to play any role in the immune changes suffered by them. Moreover, alcohol and drug abuse were some of the exclusion criteria considered in the present work. However, additional research is needed to address these questions more fully.

In this study, another possible mechanism linking homelessness to impaired immune function was checked through the analysis of stress-related changes in both the HPA-axis and pro-inflammatory cytokine production. Anxiety and depression are often associated with disturbed HPA regulation [13, 52]. Cortisol plays an important role in the regulation of emotion [20], and several studies have shown that its increase has a depressive effect on immune function, changing immune cell trafficking, proliferation, cytokine secretion, antibody production and cytolytic activity [22, 23]. Consequently, increased levels of TNF- α were found in whole blood samples from anxious women cultured in the same conditions as those used in the present work [52]. However, no changes to this pathway were shown by the homeless

population. Again, although changes in HPA regulation under stress, anxiety and depression have been widely studied, they are not completely understood yet due to the high degree of overlap among the 3 conditions. Lechin et al. [65] pointed out that the inability to cope with stress leads to raised plasma cortisol whereas depression shows an opposite profile consisting in adrenomedullary gland hyporesponsiveness. Nevertheless, contradicting results on depression and cortisol have been described in the literature. Besides, anxiety has been related to increased plasma cortisol levels [52]. According to this, individuals suffering from all 3 conditions might as well show no change in the plasma levels of this hormone. Thus, other hormones and neurotransmitters, such as noradrenaline, adrenaline, dopamine, serotonin, β -endorphin or melatonin, would stand out as candidates for further research attempting to better understand the immune function changes taking place in the homeless population.

It is important to consider that although, in this study, the samples were collected during a very strict short 4-hour interval of the day (from 10:00 to 14:00 h), this could have been a bias source, since cortisol has a very pronounced diurnal rhythm with maximum levels being achieved early in the morning which decrease throughout the day. Therefore, our results on this matter should be considered with caution. Moreover, another limitation of the present work derives from the fact that the sleep and awake periods could be different for the homeless and the housed sample, which could influence the rhythm of the HPA axis by inducing a shift in the glucocorticoid nycthemeral rhythm and thus in the modulation of the immune system functioning. Thus, future studies reducing the collection period and performing multiple assessments per subject and day are advisable. Besides, because of technical reasons, some of the measurements for cortisol, plasma antioxidants and cytokines were not performed in all the samples, which might have negatively affected the statistical power of this work.

In addition, we constituted a homeless sample as representative as possible, establishing exclusion criteria based on mental and physical health criteria, which could bias the measurements of interest. However, the time spent homeless by subjects from this group was relatively short, and some of them were not strictly homeless but inadequately housed people. The immunological differences found could be particularly noteworthy because the sample in this study may be healthier than the general population of homeless people. Finally, our results would need to be confirmed in a larger sample.

Conclusions

The findings of this work have significant implications for health care policy and future research. The presence of an impaired immune function in homeless people may explain their increased susceptibility to infections and may also predispose them to advancement of existing illness processes, such as cancer, thus contributing to higher morbidity and mortality in these individuals. Further studies are required to find possible pathways linking homelessness to immune response, although oxidative stress does seem to play a major role. Thus, strategies attempting to improve the immune function and decrease the oxidative stress suffered by leukocytes could be of great interest to those aiming to improve the quality of life of the homeless population.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (BFI 2001-1218 and BFU2005-06777) and RETI-CEF (RD06/0013/0003). The authors would like to thank the staff members of the San Vicente de Paul Integral Program (Daughters of Charity Foundation) for their cooperation and support.

References

- 1 Toro PA, Warren MG: Homelessness in the United States: policy considerations. *J Comm Psychol* 1999;27:119-136.
- 2 Hwang SW: Mortality among men using homeless shelters in Toronto, Ontario. *JAMA* 2000;283:2152-2157.
- 3 Wright JD, Weber E: Homelessness and Health. New York, McGraw-Hill, 1987.
- 4 Zlotnick C, Tam T, Robertson MJ: Disaffiliation, substance use, and exiting homelessness. *Subs Use Misuse* 2003;38:577-599.
- 5 Shinn M, Knickman J, Weitzman B: Social relationships and vulnerability to becoming homeless among poor families. *Am Psychol* 1991;46:1180-1187.
- 6 Muñoz M, Vázquez C, Bermejo M, Vázquez JJ: Stressful life events among homeless people: quantity, types and perceived causality. *J Comm Psychol* 1999;27:73-87.
- 7 Goodman L, Saxe L, Harvey M: Homelessness as psychological trauma: broadening perspectives. *Am Psychol* 1991;46:1219-1225.

- 8 Pleace N: Single homelessness as social exclusion: the unique and the extreme. *Soc Policy Adm* 1998;32:46-59.
- 9 Hwang SW: Homelessness and health. *Can Med Assoc J* 2001;164:229-233.
- 10 Vázquez C, Muñoz M, Crespo M, Guisado AB, Dennis M: A comparative study of the 12-month prevalence of physical health problems among homeless people in Madrid (Spain) and Washington, DC (USA). *Internat J Mental Health*; in press.
- 11 Wong YL, Piliavin I: Stressors, resources, and distress among homeless persons: a longitudinal analysis. *Soc Sci Med* 2001;52:1029-1042.
- 12 Vázquez C, Muñoz M: Homelessness, mental health and stressful life events: the Madrid experience. *Internat J Mental Health* 2001;30:6-25.
- 13 Raoult D, Foucault C, Brouqui P: Infections in the homeless. *Lancet Infect Dis* 2001;1:77-84.
- 14 Cheung RC, Hanson AK, Maganti K, Keefe EB, Matsui SM: Viral hepatitis and other infectious diseases in a homeless population. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:476-480.
- 15 O'Connell JJ: Nontuberculous respiratory infections among the homeless. *Semin Respir Infect* 1991;6:247-253.
- 16 Chau S, Chin M, Chang J, et al: Cancer risk behaviors and screening rates among homeless adults in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:431-438.
- 17 Glaser R: Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2005;19:3-11.
- 18 Koh KB: Emotion and immunity. *J Psychosom Res* 1998;45:107-115.
- 19 Lundberg U: Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:1017-1021.
- 20 Müller MB, Holsboer F, Keck ME: Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides* 2002;36:117-131.
- 21 Rabin BS: Stress, Immune Function, and Health: The Connection. New York, Wiley-Liss & Sons, 1992.
- 22 Madden KS, Livnat S: Catecholamine action and immunologic reactivity; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): *Psychoneuroimmunology*, ed 2. San Diego, Academic Press, 1991, pp 283-310.
- 23 Padgett DA, Glaser R: How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444-448.
- 24 Pressman S, Cohen S, Miller GE, Barkin A, Rabin IBS, Treanor JJ: Loneliness, social network size, and immune response to influenza vaccination in college freshmen. *Health Psychol* 2005;24:297-306.
- 25 Eisenberger NI, Lieberman MD, Williams KD: Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion. *Science* 2003;302:290-292.
- 26 Silver H: Social exclusion and social solidarity: three paradigms. *Int Labour Rev* 1994;133:531-577.
- 27 Schleifer SJ, Keller SE, Shiflett S, Benton T, Eckholdt H: Immune changes in alcohol-dependent patients without medical disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1199-1206.
- 28 Capo C, Amirayan-Chevillard N, Brouqui P, Raoult D, Mege JL: *Bartonella quintana* bacteremia and overproduction of interleukin-10: model of bacterial persistence in homeless people. *J Infect Dis* 2003;187:837-844.
- 29 Jackson LA, Spach DH: Emergence of *Bartonella quintana* infection among homeless persons. *Emerg Infect Dis* 1996;2:141-144.
- 30 Miller RA: The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996;273:70-74.
- 31 Wayne ST, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS: Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:45-98.
- 32 Aspinall R: Longevity and the immune response. *Biogerontology* 2000;1:273-278.
- 33 De la Fuente M: Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:55-58.
- 34 Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002;134:41-48.
- 35 Guayerbas N, De la Fuente M: An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339-350.
- 36 Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B: Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol* 1995;50:378-382.
- 37 Levy SM, Herberman RB, Lee J, et al: Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. *Nature Immun Cell Growth Regul* 1991;10:536-539.
- 38 Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:249-256.
- 39 Victor VM, Rocha M, De la Fuente M: Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327-347.
- 40 Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J: An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961;4:561-571.
- 41 Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA: An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol* 1988;56:893-897.
- 42 Beck AT, Steer RA, Gardin MG: Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: twenty-five years of evaluation. *Clin Psychol Rev* 1988;8:77-100.
- 43 Vázquez C, Sanz J: Fiabilidad y validez de la versión española del Inventario para la Depresión de Beck de 1978 en pacientes con trastornos psicológicos [Reliability and validity of the Spanish version of the 1978 Beck Depression Inventory in patients with psychological disorders]. *Clínica y Salud* 1999;10:59-81.
- 44 Beck AT: Beck Anxiety Inventory, Spanish version. San Antonio, Psychological Corporation, 1993.
- 45 De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A: Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J Endocrinol* 1997;153:475-483.
- 46 Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F: Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 β , interleukin-6 and tumour necrosis factor- α production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol* 1996;71:25-30.
- 47 De la Fuente M, Victor VM: Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000;78:49-54.
- 48 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F: Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Rad Res* 2008;42:272-280.
- 49 Ferrández MD, Correa R, Del Río M, De la Fuente M: Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675-685.
- 50 Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M: Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:797-804.
- 51 Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M: A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:157-162.
- 52 Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M: Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007;62:1-8.
- 53 Sacerdote P, Panerai AE, Frattola L, Ferrarese C: Benzodiazepine-induced chemotaxis is impaired in monocytes from patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:243-249.
- 54 Maes M, Stevens W, DeClerck L, et al: Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and superoxide release in depressive illness. *Biol Psychiatry* 1992;31:1220-1224.
- 55 Leonard BE, Song C: Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:299-303.

- 56 Kiecolt-Glaser JK, Ricker D, George J, et al: Urinary cortisol levels, cellular immunocompetency, and loneliness in psychiatric patients. *Psychosom Med* 1984;46:15-23.
- 57 Maes M, Bosmans E, Suy E, Minner A, Raus J: Impaired lymphocyte stimulation by mitogens in severely depressed patients. *Br J Psychiatry* 1989;155:793-798.
- 58 Bor DH, Epstein PR: Pathogenesis of respiratory infection in the disadvantaged. *Semin Respir Infect* 1991;6:194-203.
- 59 Herbert TB, Cohen S: Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull* 1993;113:472-486.
- 60 Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M: Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int Immunopharmacol* 2003;3:97-106.
- 61 Arai T, Yamada H, Namba T, et al: Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1185-1193.
- 62 Solana R, Alonso MC, Peña J: Natural Killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 1999;34:435-443.
- 63 Wong YL, Piliavin I: Stressors, resources, and distress among homeless persons: a longitudinal analysis. *Soc Sci Med* 2001;52:1029-1042.
- 64 Wu W, Yamaura T, Murakami K, et al: Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci* 2000;66:1827-1838.
- 65 Lechin F, Van der Dijs B, Benaim M: Stress versus depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996;20:899-950.



ORIGINAL/Sección Biológicas

El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario

Lorena Arranz^a, Lydia Giménez-Llort^b, Nuria M. De Castro^a, Isabel Baeza^a y Mónica De la Fuente^{a,*}

^a Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^b Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de junio de 2008

Aceptado el 11 de diciembre de 2008

On-line el 8 de mayo de 2009

Palabras clave:

Aislamiento social

Envejecimiento

Ansiedad

Neofobia

Aprendizaje

Memoria

Actividad de las células NK naturales

RESUMEN

Introducción: Los estudios de la Organización Mundial de la Salud indican que las personas viudas muestran menores índices de salud física y mental que el resto de la población de la misma edad cronológica. Por otra parte, la viudez y el aislamiento social son condiciones frecuentes en los mayores; sin embargo, las mujeres son las que presentan mayor incidencia, dada su mayor esperanza de vida media. Así, el objetivo del presente trabajo fue crear un modelo animal de soledad durante la vejez para estudiar en éste los cambios en el perfil cognitivo, conductual e inmunitario a los que conduce el aislamiento social en esta etapa de la vida.

Materiales y métodos: Veinte ratones hembras de la cepa C57b/129sv establecidos en grupos de 4 a 5 animales hasta su vejez (18 meses de edad) siguieron en grupo (grupo control, $n = 10$) o se aislaron a partir de ese momento y hasta alcanzar 24 meses de edad (ratones aislados, $n = 10$). A esta edad avanzada los animales realizaron una serie de pruebas para valorar neofobia (test de esquinas), ansiedad (campo abierto) y aprendizaje y memoria (laberinto acuático de Morris). Posteriormente, se sacrificó a los animales, se obtuvo el timo y de éste la suspensión celular en la que se analizó la capacidad citotóxica de las células natural killer (NK) frente a la línea tumoral murina YAC-1.

Resultados: El estudio conductual puso de manifiesto que los animales aislados durante la vejez muestran un declive funcional y cognitivo, con aumento de la neofobia y de la ansiedad así como problemas de aprendizaje y memoria. Además, la soledad conduce a una disminución de la actividad de las células NK tímicas.

Conclusiones: Se demuestra la importancia del aislamiento y de la soledad durante la vejez, lo que exacerbaba la involución mental e inmunitaria durante este período a pesar de haber mantenido una vida social normal durante las etapas vitales anteriores.

© 2008 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment

ABSTRACT

Introduction: Several studies by the World Health Organization indicate that widows and widowers show lower physical and mental health indexes than the age-matched general population. In addition, widowhood and social isolation are common in the elderly, with women being more affected than men due to their longer life span. Thus, the aim of the present study was to create an animal model of solitude in old age to study the behavioral, cognitive and immunological changes induced by social isolation at this late stage of life.

Material and methods: Twenty female C57b/129sv mice, housed in groups of 4-5 until their old age (18 months), remained in groups (controls, $n = 10$) or were isolated after reaching the age of 18 months and until they reached the age of 24 months (isolated, $n = 10$). At this advanced age, the animals were submitted to a battery of tests to assess neophobia (corner test), anxiety (open-field test), and learning and memory (Morris water maze). Thereafter, the animals were sacrificed and the thymus was removed. The natural killer (NK) activity of the thymic cells against the YAC-1 murine tumor cell line was evaluated.

Results: Animals isolated during old age showed functional and cognitive decline, with increased neophobia and anxiety as well as learning and memory deficits. In addition, isolation reduced the NK activity of thymic cells.

Conclusions: We demonstrate the importance of social isolation and solitude during old age. Both social isolation and solitude exacerbate mental and immunological involution during this period, despite normal social life during previous stages of life.

© 2008 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Social isolation

Aging

Anxiety

Neophobia

Learning

Memory

Natural killer activity.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mondelaf@bio.ucm.es (M. De la Fuente).

Introducción

Es bien conocido que el envejecimiento conduce a un deterioro conductual muy marcado, de modo que los individuos de edad avanzada muestran dificultades para afrontar situaciones novedosas de la vida diaria (aunque éstas no supongan peligro alguno) y muestran mayores grados de ansiedad, lo que los autores de este artículo junto con otros autores han demostrado tanto en humanos^{1,2} como en ratones^{3,4}. De igual forma, numerosas aportaciones científicas han evidenciado el declive cognitivo en el aprendizaje y la memoria que se produce en ambos al avanzar la edad^{5,6}.

Por otra parte, el sistema inmunitario parece ser especialmente vulnerable al proceso de envejecimiento⁷, mientras que su deterioro se encuentra íntimamente relacionado con la morbi-mortalidad asociada a la edad debido al declive de las funciones defensivas esenciales que este sistema ejerce en el organismo. El riesgo de presentar infecciones y la gravedad de éstas aumentan en la vejez, al igual que la susceptibilidad al cáncer⁸. Esto último puede ser, en parte, consecuencia del deterioro en la función antitumoral de las células *natural killer* (NK) que se da con la edad^{9,10}. Además, la capacidad de preservar una función inmunológica adecuada ha demostrado ser un buen marcador de salud y predictor de longevidad¹¹, lo que queda evidenciado en el caso de los sujetos centenarios¹².

El aislamiento social es una situación frecuente en los mayores. El anciano siente una falta de compañía, de afecto y de apoyo que se agrava por la carencia de relaciones sociales de calidad. Entre las posibles causas se encuentran varias circunstancias a las que el anciano debe hacer frente en esta etapa de la vida: la jubilación, la dificultad para encontrar amistades nuevas, la existencia de cierto rechazo por parte de la sociedad y, de forma muy destacada, la viudez y la pérdida de otros seres queridos. Todo esto conduce a una privación de apoyo emocional, físico y económico ante la que el anciano tiene menor capacidad de respuesta.

Estudios de la Organización Mundial de la Salud indican que las personas viudas muestran menores índices de salud física y mental que el resto de la población de la misma edad cronológica¹³; sin embargo, las mujeres son las más afectadas debido a su mayor esperanza de vida media¹⁴. Así, el aislamiento social se considera un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades en los mayores¹⁵ o en las discapacidades que se presentan como resultado de éstas¹⁶ (en consecuencia, también es un factor de riesgo de morbi-mortalidad¹⁷). Dada la íntima comunicación que hay entre los sistemas nervioso e inmunológico¹⁸, la disregulación inmunitaria que se produce en los mayores, tanto por se como por consecuencia del deterioro del sistema nervioso, puede ser un elemento clave que deteriora la salud a la hora de afrontar todas estas emociones negativas mencionadas con anterioridad¹⁹.

En vista de lo comentado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue crear un modelo animal de soledad durante la vejez y estudiar en éste los cambios en algunos parámetros del perfil cognitivo, conductual e inmunitario a los que puede conducir el aislamiento social en esta etapa de la vida.

Material y métodos

Modelo animal

Se emplearon 20 ratones hembras de la cepa C57b/129sv estabulados en el Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona. Los animales vivieron en grupos de 4 a 5 hasta su vejez (18 meses de edad). A partir de ese momento se mantuvieron en

grupo (grupo control, $n = 10$) o aislados hasta alcanzar 24 meses de edad (ratones aislados, $n = 10$).

En las condiciones de estabulación se usaron jaulas makrolon IV estándares ($35 \times 35 \times 25$ cm) con un lecho de 10 cm de serrín y con agua y comida ad libitum (dieta de acuerdo con las recomendaciones del American Institute of Nutrition para animales de laboratorio). Las condiciones de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad (entre el 50 y el 60%) y luz (ciclos de 12 h, con encendido de luces a las 9.00) se controlaron diariamente.

Los animales se trataron en todo momento de acuerdo con los principios descritos en las European Community Council Directives (1201/2005 EEC).

Estudios conductuales

A la edad avanzada de 24 meses, los animales realizaron una serie de pruebas conductuales estandarizadas, útiles para detectar alteraciones conductuales en roedores²⁰ y que valoran neofobia (test de esquinas), ansiedad (campo abierto) y aprendizaje y memoria (laberinto acuático de Morris). El día anterior al inicio de estas pruebas, los animales se identificaron mediante rotulación de la cola con un número blanco. El orden de los animales en las distintas pruebas se contrabalanceó por la situación «ratones en grupo y ratones solos». Dentro de los animales en grupo, se eligió uno de cada jaula antes de escoger otro animal de la misma jaula con el fin de minimizar la manipulación repetida. Las pruebas conductuales se realizaron en la misma sala de estabulación (test de esquinas) o en una sala contigua (campo abierto y laberinto acuático de Morris) y siempre dentro de un rango horario estrecho (entre las 10.00 y las 13.00) para evitar efectos debido al ritmo circadiano.

Test de esquinas

El test de esquinas utilizado para evaluar la neofobia o el miedo a la novedad consiste en colocar al animal en el centro de una jaula cuadrangular idéntica a las que se utilizan para la estabulación. La jaula está descubierta y llena de un lecho de 10 cm de serrín. El experimentador observa la conducta espontánea del animal y anota el número de esquinas que el animal visita en un período de 30 s. Se utiliza una jaula distinta para cada animal, para evitar interferencias en esta conducta debido al rastro de olor de otro animal.

Campo abierto

Una vez finalizado el test de esquinas, el animal permanece en la jaula y se lo traslada a una sala contigua pintada de negro en la que se evalúa durante 5 min su conducta en un «campo abierto» (caja de madera de fabricación artesanal de $50 \times 50 \times 25$ cm) de color blanco e iluminado (20 lx). Estas circunstancias no resultan cómodas para el animal, por lo que genera cierta aversión frente a éstas. Así, el tiempo que el ratón necesita para salir del área central (latencia del centro) o para iniciar la conducta de acicalamiento (latencia de *grooming*) son medidas estándares que permiten valorar su grado de emotividad y de ansiedad. Después de efectuar la prueba a cada animal, la caja se limpia rigurosamente con agua y alcohol.

Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris²¹ permite realizar distintas tareas de aprendizaje y de memoria espacial. El laberinto consiste en una piscina de 90 cm de diámetro llena de agua a temperatura templada (25°C) hasta 15 cm por debajo del límite superior de la pared y en la que es posible colocar una plataforma no visible sumergida 1 cm por debajo de la altura del agua, que permite al animal subir a ésta a descansar y así acabar la prueba.

Cada día, los animales se trasladan a la sala en la que se realiza esta prueba y en la que hay 20 jaulas individuales (35 × 35 × 25 cm) con 10 cm de serrín, una para cada animal. En cada sesión, se introduce el animal con delicadeza en la piscina en uno de los puntos cardinales (norte, sur, este y oeste) escogido previamente de forma aleatorizada. La primera tarea que realizan los animales en el laberinto es el «aprendizaje de la posición de la plataforma». Consiste en aprender y recordar dónde está la plataforma (fija en medio del cuadrante sudeste) durante 4 sesiones diarias espaciadas en 15 min (memoria a corto plazo) y durante varios días consecutivos (memoria a largo plazo), hasta que los animales encuentran la plataforma en un mínimo de tiempo que además es idéntico (llegan a la asíntota) durante 2 días consecutivos.

Una vez que los animales han aprendido en qué consiste la prueba y dónde está la plataforma, se los expone a 2 pruebas nuevas²² que consisten en 4 ensayos consecutivos de «memoria de trabajo»²³ en los que el animal se introduce en la piscina 5 s después de haber realizado el ensayo anterior. En cada una de éstas, la posición de la plataforma es distinta a la que tuvo durante la prueba anterior y se les concede un máximo de 90 s para encontrarla (dado que se espera que inicialmente los animales continúen buscando la plataforma allí donde estuvo durante los 4 días previos y, por tanto, necesitan más tiempo para encontrarla).

En la primera prueba, la plataforma sumergida ha cambiado de posición respecto a los días anteriores, se encuentra ahora a 180° (en medio del cuadrante noroeste) y los animales entran en la piscina desde el sur. El segundo día, la plataforma se encuentra en el centro de la piscina y los animales entran por el este. Para finalizar, se realiza una cuarta prueba de «aprendizaje de plataforma visible» para contrastar diferencias de atención o de motivación, que consiste en 4 ensayos distanciados por 15 min (entradas por el oeste, sur, norte y este, respectivamente), en la que se mide el tiempo que el animal necesita para subir a la plataforma. Tienen un máximo de 60 s cuando la plataforma está visible (elevada 0,5 cm respecto a la altura del agua), en posición noroeste y señalizada de forma vistosa con una bandera a rayas negras y blancas. En todas las pruebas, cuando el animal no encuentra la plataforma en el tiempo estipulado, el experimentador lo coloca en ésta durante 10 s, exactamente el mismo tiempo que permanecen los animales en ésta cuando la encuentran por sí solos.

Estudios inmunológicos

Obtención de las células inmunitarias

Una vez finalizadas las pruebas de conducta, se sacrificó a los animales por dislocación cervical de acuerdo con las directrices descritas en las European Community Council Directives (86/6091 EEC). Se obtuvo el timo de forma aséptica, se liberó de las impurezas visibles y se trasladó inmediatamente en medio RPMI 1640 frío (PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Austria) al Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Universidad Complutense de Madrid. Una vez allí, se homogeneizó de forma manual en un medio de solución salina de fosfato (PBS), presionando con suavidad a través de una malla metálica (Sigma, St. Louis, EE. UU). La suspensión de las células tímicas resultante se lavó y se determinó su número mediante microscopía óptica. Se ajustó posteriormente a 10⁶ células/l en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Austria) para la realización del análisis. La viabilidad celular, medida de forma habitual antes y después de cada experimento a través del test de exclusión Azul Tripán (Sigma, St. Louis, EE. UU), fue superior al 98% en todos los casos.

Actividad antitumoral de las células natural killer

Se empleó un método colorimétrico enzimático para medir la lisis de las células diana (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim, Alemania) basado en la determinación de la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa mediante sales de tetrazolio¹⁰. Brevemente, el análisis consistió en incubar las células diana (células YAC-1 procedentes de un linfoma murino; 10⁴ células/pocillo) junto con las células efectoras (células del timo; 10⁵ células/pocillo) en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en «U» (Nuncclon, Dinamarca). Las placas se centrifugaron a 250 g durante 4 min para facilitar los contactos celulares y se incubaron durante 4 h a 37 °C en una atmósfera húmeda y al 5% de dióxido de carbono. Se empleó medio RPMI 1640 sin rojo fenol que no interfiere con la determinación colorimétrica. Tras la incubación, se midió la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa en 50 µl del sobrenadante de cada pocillo mediante la adición del sustrato de la enzima y la posterior medida de la absorbancia a 490 nm. Además, se llevaron a cabo varias medidas de control para conocer la lisis espontánea de las células diana y de las células efectoras, así como la lisis total de las células diana.

Los resultados se expresaron como porcentaje de lisis. Para su cálculo, se siguió la ecuación que se indica a continuación: $\text{lisis (\%)} = [(E-ES-TS)/(M-TS)] \times 100$ donde *E* es la media de las absorbancias en presencia de células efectoras y de células diana, *ES* es la media de las absorbancias en los pocillos de células efectoras solas, *TS* es la media de las absorbancias en los pocillos de células diana solas y *M* es la media de las absorbancias máximas obtenidas tras la incubación de las células diana con solución de lisis.

Estadística

En primer lugar, se comprobó la normalidad de las muestras mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los 2 grupos experimentales se analizaron mediante el test de la *t* de Student para muestras independientes. En el laberinto acuático de Morris, las diferencias entre grupos durante los distintos ensayos o durante los distintos días se evaluaron con el análisis ANOVA (análisis de la variancia) para medidas repetidas, mientras que las comparaciones entre grupos en un ensayo concreto se evaluaron con el test de la *t* de Student para muestras independientes. En todos los casos, la significación estadística se consideró a partir de $p < 0,05$.

Resultados

Estudios conductuales

El estudio conductual pone de manifiesto que los animales aislados durante la vejez muestran un declive funcional y cognitivo con un aumento en pautas de neofobia y ansiedad, así como problemas de aprendizaje y memoria.

Como se indica en la figura 1, los animales que se aislaron en la vejez realizaron menos exploraciones de las esquinas de la jaula nueva que aquellos que continuaron estabulados en grupo (test de la *t* de Student; $p < 0,05$).

En el campo abierto (fig. 2), el análisis de las latencias de salida del recuadro central (fig. 2A) o de la conducta de acicalamiento (fig. 2B) indica que los animales mantenidos en aislamiento tienen valores superiores a los animales mantenidos en grupo (test de la *t* de Student; $p < 0,05$ en ambos casos).

En la figura 3A se ilustran los resultados por ensayos diarios de las pruebas realizadas en el laberinto acuático de Morris. En la prueba de aprendizaje de la posición de la plataforma, los 2 grupos

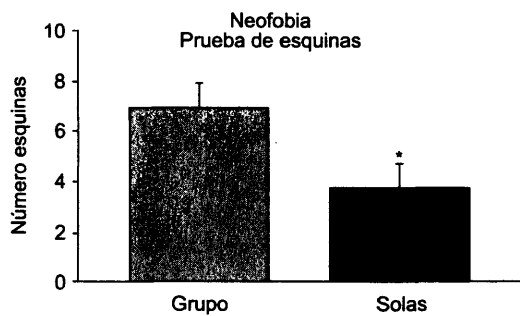


Figura 1. Prueba de las esquinas para valorar la neofobia. Se representa el número de esquinas que visitan ratones hembras viejas mantenidas en grupo (grupo) y aisladas en la vejez (solos). Cada columna representa la media \pm error estándar de 10 valores correspondientes a 10 animales. * $p < 0,05$ respecto al valor obtenido en los animales mantenidos en grupo.

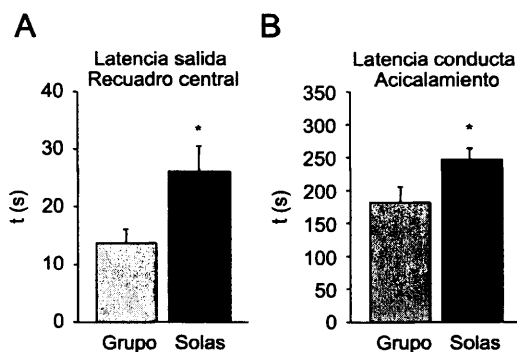


Figura 2. Prueba de campo abierto para valorar la ansiedad y la emotividad. Cada columna representa la media \pm error estándar de 10 valores correspondientes a 10 animales. A) Se representa la latencia en segundos de la salida del recuadro central. B) Se representa la latencia en segundos de la conducta de acicalamiento en ratones hembras viejas mantenidas en grupo (grupo) y aisladas en la vejez (solos). * $p < 0,05$ respecto al valor obtenido en los animales mantenidos en grupo.

experimentales muestran curvas de aprendizaje similares durante los 4 días que dura la prueba, pero cuando se analizan los 4 ensayos realizados en cada uno de los 4 días se observa que la diferencia entre el primer y el último ensayo del primer día es positiva en los animales aislados, con una tardanza o un aumento del tiempo de $2,9 \pm 5,3$ s respecto a la mejora de $-18,9 \pm 10,6$ s mostrada por los animales mantenidos en grupo. Esto se traduce en una diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el tiempo que ambos grupos necesitan para encontrar la plataforma en este último ensayo del primer día (test de la t de Student; $p < 0,05$). Además, en la primera prueba de memoria de trabajo, en la que se cambió la posición de la plataforma respecto a los 16 ensayos anteriores, los animales en grupo muestran mayores tiempos comparativamente a los animales aislados (test de la t de Student, $p < 0,05$) mientras que en la segunda prueba de memoria de trabajo ya no se aprecian diferencias entre los 2 grupos experimentales (fig. 3B). Esto evidencia que los animales en grupo mantienen el recuerdo de la posición de la plataforma durante los 4 días anteriores y continúan buscándola allí donde estuvo en esos días, mientras que los animales aislados la encuentran con la misma dificultad que cuando realizaron la primera prueba en el laberinto. Una vez que los animales aprenden que la posición de la plataforma puede cambiar respecto a días anteriores, las diferencias entre ambos grupos desaparecen.

Estudios inmunológicos

Por otra parte, la soledad en la vejez conduce a una disminución estadísticamente significativa de la actividad lítica

de las células NK tímicas (grupo control: $27 \pm 2\%$; ratones aislados: $15 \pm 1\%$; $p < 0,001$) (fig. 4).

Discusión

Este trabajo presenta el primer modelo animal que aborda experimentalmente una situación común para muchas personas mayores que por distintas razones experimentan la soledad durante su vejez tardía a pesar de haber gozado de una vida social activa en etapas anteriores.

En humanos, el declive cognitivo y físico asociado a la edad está caracterizado por mayores tiempos de reacción, disminución de la capacidad de atención y de concentración así como peor memoria a corto y largo plazo; la novedad y el grado de dificultad son los factores más relevantes que condicionan el declive²⁴.

El modelo animal de soledad en el envejecimiento muestra disminución de respuestas en la prueba de las esquinas para la neofobia y aumento de latencias en el campo abierto. Esto es indicativo de que el individuo de edad avanzada aislado socialmente tiene más dificultades para desenvolverse con normalidad en ambientes nuevos o potencialmente anógenos que el individuo que continúa viviendo en comunidad. Justamente estas variables son las mismas que se encuentran afectadas en modelos animales mutantes que muestran ansiedad y menor supervivencia²⁰, y son también las variables que en ratones tripl transgénicos 3xTgAD sirven para describir cambios similares a algunos de los síntomas neuropsiquiátricos típicos asociados a la enfermedad de Alzheimer, incluso se anticipan a la aparición de las primeras deficiencias cognitivas leves y avanzan en paralelo con el posterior curso de la demencia^{25,26}. Todo esto demuestra que los individuos expuestos a la soledad en su edad avanzada pueden tener una mayor vulnerabilidad a los trastornos mentales.

La capacidad para adaptarse a situaciones nuevas que además implican funciones cognitivas superiores, como el aprendizaje y la memoria, también es menor en los animales viejos aislados. En el primer día de test en el laberinto acuático de Morris, los animales no muestran ninguna mejora durante los 4 ensayos, lo que significa que no consiguen entender en qué consiste la tarea que deben realizar o que no recuerdan con igual eficacia dónde está la plataforma sumergida. Sin embargo, la repetición de la tarea en días sucesivos ayuda a optimizar los resultados y reduce las diferencias entre los 2 grupos experimentales, probablemente porque la repetición de la tarea implica la reducción de la novedad y de la dificultad y ayuda a los procesos de consolidación de la memoria. Es decir, a pesar de presentar mayor dificultad inicial, los individuos viejos aislados mejoran con la práctica.

Estos resultados se reiteran cuando en la segunda y la tercera prueba se exige a los animales aprender una nueva localización de la plataforma. Se observa claramente que todos los animales requieren más tiempo para encontrarla porque no se localiza allí donde la encontraron durante los 16 ensayos realizados en los días anteriores. En general, los animales de edad avanzada mantenidos en grupo social necesitan más tiempo para encontrar la plataforma en la nueva localización que los animales aislados probablemente porque recuerdan mejor la antigua posición e insisten más en buscarla en la zona en que estuvo.

En la tercera prueba la situación de posible cambio de la plataforma parece predecible y ambos grupos muestran igual eficacia en su búsqueda. Es interesante observar que cuando la plataforma está visible, los 2 grupos experimentales invierte exactamente el mismo tiempo en encontrar la plataforma, como ocurrió en los días 3 y 4 de su adquisición, lo que indica que en situaciones controladas y de baja dificultad (la plataforma se encontraba en un lugar conocido a causa de la práctica, visible

Aprendizaje y memoria Laberinto acuático de morris Latencia en cada ensayo

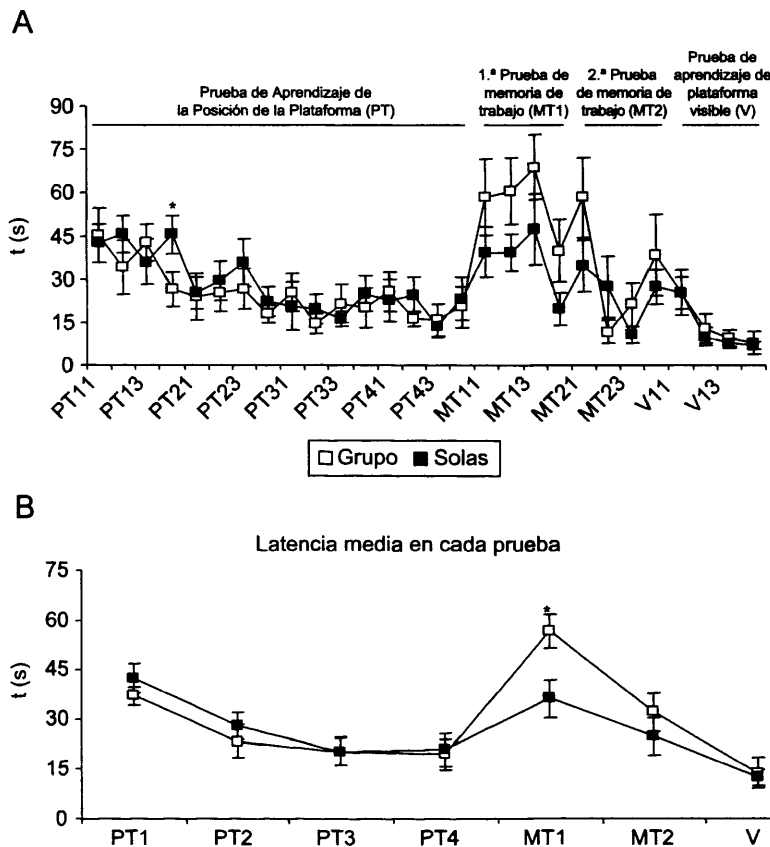


Figura 3. Laberinto acuático de Morris para valorar el aprendizaje y la memoria (latencias por segundos) en ratones hembras viejas mantenidas en grupo (grupo) y aisladas en la vejez (solas). Cada punto representa la media \pm error estándar de 7 a 9 valores correspondientes a ese mismo número de animales. * $p < 0,05$ respecto al valor obtenido en los animales mantenidos en grupo. A) En cada ensayo. B) Media de cada prueba. MT1 y MT2) Pruebas de memoria de trabajo, días uno y 2, respectivamente; cada día consta de 4 sesiones. PT1, PT2, PT3 y PT4) Prueba de la adquisición de la plataforma, días uno a 4, respectivamente; cada día consta de 4 sesiones. V) Prueba de la plataforma visible que consta de 4 sesiones.

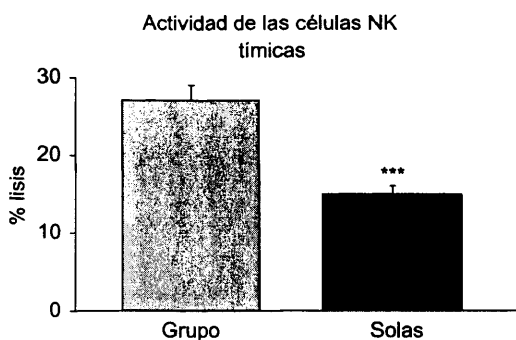


Figura 4. Actividad lítica frente a células tumorales (% lisis) de las células natural killer (NK) tímicas procedentes de ratones hembras viejas mantenidas en grupo (grupo) y aisladas en la vejez (solas). Cada columna representa la media \pm error estándar de 7 a 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales. Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. * $p < 0,001$ respecto al valor obtenido en los animales mantenidos en grupo.

muy bien indicada) los animales viejos aislados no se diferencian de los animales mantenidos en grupo.

Por tanto, generalmente el aislamiento en la vejez afecta a la capacidad de respuesta a situaciones novedosas, potencialmente ansiogénicas y que requieren funciones superiores de aprendizaje

y memoria, pero los individuos mejoran con la disminución de la novedad o con la disminución del grado de dificultad y se benefician de la práctica.

Paralelamente al deterioro cognitivo y físico asociado a la edad, la vejez comporta cambios funcionales en el sistema inmunitario que se conocen como inmunosenescencia. Dada la esencial función defensora frente a agentes extraños y antitumoral que este sistema ejerce en el organismo, el mantenimiento de una respuesta inmunitaria adecuada se considera como un excelente marcador de salud e incluso se ha relacionado con la longevidad de los individuos¹¹. Es bien sabido que al envejecer aumenta la incidencia de infecciones y cáncer⁸; enfermedades relacionadas directamente con la funcionalidad de los leucocitos y más concretamente con la actividad citotóxica natural de las células NK en el caso de procesos víricos y tumorales. De hecho, esta función parece ser especialmente sensible al proceso de envejecimiento y demuestra ser un buen predictor de longevidad en modelos animales²⁷.

Por otra parte, el sistema nervioso y el sistema inmunitario se encuentran íntimamente relacionados y forman una compleja red de interacciones bidireccionales que mantiene la homeostasis del organismo y, por tanto, la salud¹⁸. Dada esta comunicación estrecha entre ambos, factores ambientales como el estrés, ya sea por aislamiento, exposición a relaciones sociales excesivamente jerárquicas u otras situaciones que implican adaptación a

cambios ambientales extremos, dañan la función inmunológica del individuo. Del mismo modo, la exposición continua a estos factores puede derivar en estados de ansiedad crónica, una alteración que tiene un fuerte impacto sobre las funciones leucocitarias claves, como lo es la actividad antitumoral de las células NK²⁸.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede deducir que ambas condiciones (envejecimiento y aislamiento) unidas en las últimas etapas de la vida tienen un efecto considerable sobre la actividad de las células NK, ya que esta función disminuye muy significativamente en los animales viejos aislados al compararlos con los animales mantenidos en grupo, en los que el deterioro es menor. Esto puede conducir a un declive acelerado de la salud y por tanto a una muerte prematura de los individuos de edad avanzada que se encuentran solos, de donde se deduce la importancia de preservar lazos sociales de calidad en la vejez. Del mismo modo, estrategias de promoción de la función inmunológica, como el ejercicio moderado²⁹ o el enriquecimiento ambiental³⁰, es decir, mantener una vida activa tanto física como mentalmente, pueden ser beneficiosas en personas mayores que tengan que afrontar la soledad.

Conclusiones

Se ha demostrado la importancia del aislamiento y de la soledad durante la vejez, lo que exacerba el deterioro mental e inmunitario durante este período a pesar de haber mantenido una vida social normal durante las etapas vitales anteriores. Además, los resultados sugieren que la realización de estrategias terapéuticas dirigidas a potenciar la interacción social y a promocionar la actividad física puede resultar beneficiosa para paliar el declive neuroinmunitario acelerado que se observa en los individuos aislados de edad avanzada.

Financiación

MEC (BFU2005-06777; SAF2006-13642), RETICEF (RD06/0013/0003) del ISCIII y una ayuda del vicerrectorado de investigación de la UAB para Grupos Emergentes (EME2006-140335) y de la UCM para el Grupo de Investigación (910379ENEROINN) han financiado este trabajo.

Este trabajo ha recibido el premio «Pañella Casas» 2007 a la mejor comunicación en forma oral del Área Biológica presentada durante el 49.º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, celebrado en Palma de Mallorca del 6 al 9 de junio de 2007.

Bibliografía

- Stein MB. Public health perspectives on generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*. 2004;65:3-7.
- Clarke DM. Growing old and getting sick: Maintaining a positive spirit at the end of life. *Aust J Rural Health*. 2007;15:148-54.
- Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol*. 2001;14:80-8.
- Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, et al. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2003;24:365-78.
- Butterfield DA, Poon HF. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2005;40:774-83.
- Ska B, Joannette Y. Normal aging and cognition. *Med Sci (Paris)*. 2006;22:284-7.
- Izgüt-Uysal VN, Tan R, Bülbül M, Derin N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol Int*. 2004;28:517-21.
- Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis*. 2000;31:578-85.
- De la Fuente M, Miñano M, Víctor VM, Del Río M, Ferrández MD, Díez A, et al. Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: A preliminary study. *Mech Ageing Dev*. 1998;102:263-77.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, et al. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology*. 2004;5:389-400.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol*. 1990;114:80-8.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: The lesson of centenarians. *Immunol Today*. 1995;16:12-6.
- Moreno J, Tarradellas Bertrán J. Las funciones superiores en la edad media de la vida. En: Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler JR, editores. *Tratado de longevidad*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 132-7.
- Candore G, Balistreri CR, Listì F, Grimaldi MP, Vasto S, Colonna-Romano G, et al. Immunogenetics, gender, and longevity. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1089:516-37.
- Arthur HM. Depression, isolation, social support, and cardiovascular disease in older adults. *J Cardiovasc Nurs*. 2006;21:2-7.
- Paul C, Ayis S, Ebrahim S. Psychological distress, loneliness and disability in old age. *Psychol Health Med*. 2006;11:221-32.
- Cacioppo JT, Hawkley LC. Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms. *Perspect Biol Med*. 2003;46:39-52.
- Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994;15:504-11.
- Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. Psychoneuroimmunology and psychosomatic medicine: Back to the future. *Psychosom Med*. 2002;64:15-28.
- Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña Pekny M, et al. Mice lacking the adenosine A₁ receptor are anxious, aggressive and common learners with reduced muscle strength and long-term survival. *Eur J Neurosci*. 2002;16:547-50.
- Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.
- Giménez-Llort L, Masino SA, Diao L, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Halldner L, et al. Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly. *Synapse*. 2005;57:8-16.
- Wishaw IQ. Formation of a place learning-set by the rat: A new paradigm for neurobehavioral studies. *Physiol Behav*. 1985;35:139-43.
- Salvador-Carulla L, García Gutiérrez JC, Ayuso Mateos JL. Enfermedad mental y longevidad. En: Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler JR, editores. *Tratado de longevidad*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 380-9.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Rosa R, Vivo M, Oddo S, et al. Model of neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTgAD mice. En: Winblad B, Avila J, editores. *Alzheimer's Disease: New Advances*. Bologna: Iqbal, Medimond; 2006. p. 513-6.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, et al. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31:121-47.
- Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2002;37:249-56.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res*. 2007;62:1-8.
- Ferrández MD, De la Fuente M. Changes with ageing, sex and physical exercise in murine natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mech Ageing Dev*. 1996;86:83-94.
- Arranz L, De Castro NM, Zambrana C, Baeza I, Viveros MP, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions and redox state in ageing mice by an enriched environment. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13:224.

Preserved immune functions and controlled leucocyte oxidative stress in long-lived mice: Key role of nuclear factor-kappaB

Lorena Arranz^a, Nuria M. De Castro^a, Isabel Baeza^a, Jorge Caamano^b, Janet M. Lord^b
and Mónica De la Fuente^a

^a Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biological Sciences,
Madrid Complutense University, Spain.

^b MRC Centre for Immune Regulation, Birmingham University Medical School,
Birmingham, United Kingdom.

Corresponding author: Mónica De la Fuente. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. Telephone number: 00 34 91 394 49 89. Fax number: 00 34 91 394 49 35. e-mail address: mondelaf@bio.ucm.es.

Running title: Immune function, oxidation and NFκB in longevity

Key words: Aging, immune function, inflammation, longevity, NFκB, oxidative stress.

Summary

Aging is associated with a decline in immune function, termed immunosenescence. However, there is great individual variability in the degree of immunosenescence, with a significant association between the degree of impairment of specific adaptive and innate immune parameters and mortality, termed the immune risk phenotype. In order to determine the mechanisms determining variability in the immune risk phenotype, we have investigated several immune functions and oxidative-inflammatory stress parameters in peritoneal leucocytes (lymphocytes, macrophages and NK cells) from ICR/CD1 female mice of different ages, i.e. adult (37±4 weeks), old (69±4 weeks), very old (92±4 weeks) and extreme long-lived (125±4 weeks). Immune cells from extreme long-lived animals showed preservation of immune function in response to stimuli, and controlled oxidative-inflammatory stress as well as NFκB activation in resting conditions, comparable with that seen in adult individuals. In contrast, the old and very old animal groups showed impaired immune function and increased oxidation/inflammation. Thus only animals with controlled basal NFκB activation in leucocytes achieved extended longevity. Our results support maintained immune function as a predictor of longevity and point to maintained regulation of NFκB activity as a key mechanism controlling inflammatory stress in immune cells and contributing to longevity.

Introduction

The capacity to preserve an adequate immune function throughout aging has been suggested as a positive healthspan marker and several age-related changes in immune functions have been related to longevity (Wayne et al., 1990; Guayerbas and De la Fuente, 2003). The dysregulation and overall impairment in host immunity that occur with aging are evidenced by the higher risk and severity of infections and the increased susceptibility to cancer among aged subjects (Miller, 1996; Castle, 2000), which exert a great influence on age-related morbidity and mortality (Wayne et al., 1990). Indeed, specific age-related changes in immune function have been shown to correlate with increased mortality, such as an increase in the CD8:CD4 T cell ratio and a reduced naive:memory T cell ratio, together termed the immune risk phenotype (ref – A, Wikby). In addition a low level of NK cell cytotoxicity in 75 year olds has been shown to be a significant predictor of mortality (Ogawa et al 2005). Thus whilst biologically older individuals showing immune competence levels characteristic of chronologically older individuals have been found to die prematurely (Guayerbas et al., 2002a; Guayerbas and De la Fuente, 2003), centenarians and exceptionally long-lived mice exhibit a high degree of preservation of several immune functions, which may be related to their ability to reach a very advanced age in healthy condition (Franceschi et al., 1995; Puerto et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008). Crucially, the primary biological processes that influence healthy aging of the immune system remain poorly understood.

Aging is characterized by a chronic low-grade inflammatory status, so-called 'inflammaging' (Franceschi and Bonafè, 2003; De Martinis et al., 2006), and oxidative stress (Harman, 1956; Barja, 2004). Recently, both theories of aging have been integrated in the Oxidative-Inflammatory theory of aging (De la Fuente et al., 2005), according to which persistent activation of transcription factors leading to sustained expression of a wide range of pro-inflammatory genes and long term oxidative stress in resting leucocytes would play a key role in immunosenescence (De la Fuente, 2008).

Chronic oxidative stress (increase in oxidants and decrease in antioxidant compounds), leads to damage of cell components, including proteins, lipids and DNA contributing to the age-related decline of physiological functions, including immune function (Pawelec et al., 2002). Indeed, chronologically older humans and mice show higher levels of inflammation and oxidative stress in their leucocytes, coincident with the impaired immune responses (De la Fuente et al., 2004; 2005; Alvarado et al., 2006a; 2006b; Arranz et al., 2007). In contrast, recent studies have shown lower expression of genes resulting in inflammation and oxidation in human centenarians, who show preserved immune functions (Capri et al., 2006). Studies are therefore now needed to understand the underlying mechanisms leading to preservation of the immune response in successful aging.

Nuclear factor-κB (NFκB) is a strong candidate for a potential mediator of the effects of inflammation and oxidative stress upon immune function. The activity of this pathway is increased in many chronic inflammatory disease states such as multiple sclerosis and acute lethal endotoxic shock (Merrill and Beveniste, 1996; Barnes and Karin, 1997; Víctor and De la Fuente, 2003). Furthermore, NFκB was found to be down-regulated by glutathione precursors such as N-acetylcysteine, which then prevented excessive oxidation and inflammation in animal models of these conditions (Víctor and De la Fuente, 2003; Víctor et al., 2003a). However, the activation status of NFκB in aging leucocytes has not been resolved, determin with the few field studies performed reporting contradictory results (Trebilcock and Ponnappan, 1996; Chung et al., 2006).

The aim of the present work was thus to study several immune function and oxidative stress parameters, which show age-related changes, as well as NFκB activation in peritoneal leucocytes of ICR/CD1 female mice of different ages, i.e. adult (37±4 weeks), old (69±4 weeks), very old (92±4 weeks) and extreme long-lived (125±4 weeks). The latter had achieved healthy and successful aging since the average lifespan for females of ICR/CD1 mice strain in our animal house is 91.9±5.6 weeks (Guayerbas et al., 2002).

Results

Lymphocyte functions and Natural Killer (NK) activity in mice of different ages

These studies were performed using unfractionated peritoneal leucocyte isolates containing lymphocytes, macrophages and natural killer (NK) cells as previously described (Puerto et al, 2005), in order to better reproduce the *in vivo* immune response. One of the most important functions of lymphocytes crucial for their role in immune responses is their proliferative capacity (Fig. 1A). Basal lymphocyte proliferation in 48h cultures was not affected by the aging process. Proliferation in response to lipopolysaccharide (LPS), mimicking bacterial infection, declined in lymphocytes from extreme long-lived animals when compared to mature adults ($P<0.01$), although the loss of proliferative capacity was much less than that seen in the old and very old age groups ($P<0.001$). In addition, proliferation stimulated by the T-cell mitogen concanavalin A (ConA) was preserved in the extreme long-lived as compared to mature adults, whereas old animals again showed a significantly decreased response ($P<0.001$). Migration of peritoneal lymphocytes to the infection focus (Fig. 1B), mimicked by the chemoattractant agent fMLP, was shown to be significantly impaired in both old and very old animals compared to mature adult individuals ($P<0.001$), whereas extreme long-lived animals preserved this function at similar levels of those shown by younger adults.

Lysis of YAC-1 tumour cells (Fig. 1C), which is mainly performed by specific cytotoxic CD8⁺ T cells, natural killer cells and macrophages, was lower in very old animals as compared to mature adults ($P<0.05$). Extreme long-lived animals showed levels of this function similar to the mature adults.

Macrophage functions and Reactive Oxygen Species (ROS) levels

The chemotactic capacity of macrophages towards the formylated peptide (Fig. 2A) was significantly impaired in very old animals ($P<0.001$) when compared to mature adults. In contrast, peritoneal macrophages from extreme long-lived mice showed increased migration compared with macrophages from mature adult individuals ($P<0.05$). Moreover, phagocytosis of latex beads (Fig. 2B and 2C), a key function of macrophages, was reduced in both old and very old animals ($P<0.001$) as compared to mature adults. Importantly macrophages from old and very old individuals not only phagocytosed less beads (fig. 2B), but also had reduced numbers of macrophages with phagocytic ability (fig. 2C). In contrast, the peritoneal macrophages from extreme long-lived animals showed intact phagocytic function. Stimulation of reactive oxygen species levels by phorbol-12-myristate-13-acetate (fig. 2D), which is a powerful activator of NADPH oxidase responsible of oxidative burst in phagocytes and T cells (cytotoxic and NK cells), was decreased in extreme long-lived individuals when compared to the adult group ($P<0.05$).

LPS-stimulated Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) and Con-A stimulated Interleukin-2 (IL-2) production

TNF- α levels were measured in 48h culture supernatants of peritoneal leucocytes in response to LPS (Fig. 3A). This pro-inflammatory cytokine is produced by macrophages and also by Th1 cells to prime the functional responses of phagocytes to microbes. The results show that LPS-stimulated levels of TNF- α were significantly decreased in old animals as compared to mature adult animals ($P<0.001$), whereas extreme long-lived mice preserved an adequate response, similar to that seen in the adult group. For Con-A stimulated IL-2 (Fig. 3B), supernatants of 48h cultures of peritoneal leucocytes from old and very old individuals showed significantly reduced levels when compared to younger subjects ($P<0.001$) whereas levels of IL-2 in the presence of ConA were found to be increased in extreme long-lived animals ($P<0.05$).

Taken together these data confirm previous reports of reduced immune response with age, but reveal that those animals surviving to extreme old age in fact maintained an immune response more similar to that seen in younger adults.

Oxidative-Inflammatory markers in mice of different ages

Redox status: Glutathione (GSH) is the principal intracellular antioxidant and plays a major role in maintenance of the intracellular redox state. Oxidized glutathione (GSSG) represents an important oxidant compound. The levels of GSSG in peritoneal leucocytes (Fig. 4A) from old animals was increased compared to mature adults ($P<0.05$), but not in the extreme long-lived animals. Xanthine oxidase (XO) is an enzyme that catalyzes the oxidation of purine bases to uric acid in a reaction that generates ROS and can also act as an NADH oxidase. XO activity (Fig. 4B) was found to be increased in leucocytes from old individuals in comparison with mature adults ($P<0.01$), but extreme long-lived mice showed similar levels to the adults.

Total glutathione content (Fig. 5A) was reduced in resting peritoneal leucocytes from old subjects ($P<0.001$) as compared to mature adults. However, leucocytes from extreme long-lived mice showed similar levels to those from adult animals. In addition, glutathione peroxidase activity (Fig. 5B), which allows the antioxidant function of glutathione and can also act as direct antioxidant, was lower in leucocytes from both old ($P<0.001$) and very old ($P<0.01$) animals when compared to mature adults. Again,

leucocytes from extreme long-lived animals showed preserved enzymatic activity. Moreover, catalase activity, which detoxifies from H_2O_2 and protects against severe oxidative stress, was also reduced in peritoneal leucocytes from very old mice ($P<0.05$) in comparison to mature adults, whereas extreme long-lived animals showed increased values ($P<0.01$).

Sustained activation of Nuclear Factor κB results in expression of a large repertoire of pro-inflammatory genes. Thus, nuclear extracts of peritoneal leucocytes were generated and the presence of NFκB-DNA binding activity was assessed by EMSA (Fig. 6A). The results show a low level of basal NFκB activation in cells from adult and extreme long-lived animals. However, leucocytes from both old and very old animals showed greater activation of NFκB compared to the adult animals ($P<0.001$), suggesting a chronic low level activation of this transcription factor in resting leucocytes with aging, but not in those animals that achieved extreme old age. It is important to note that only one out of ten individuals analyzed from the old and very old age groups ultimately achieved extreme longevity (138 and 132 weeks, respectively) and interestingly these two mice were the ones showing controlled NFκB activation in their leucocytes. To confirm the pro-inflammatory consequences of chronic NFκB activation we measured TNF-α levels in supernatants from 48h cultures of peritoneal leucocytes with no exogenous stimulus (Fig. 6B) and found that the levels of this cytokine showed a similar profile to the basal NFκB activation seen in the different age groups. Basal TNF-α was found to be increased in old ($P<0.05$) and very old individuals ($P<0.001$), as compared to adults, whereas the extreme long-lived showed similar values to the adult group.

Anti-inflammatory response

Levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine produced by Th2 cells, were measured in supernatants from 48h cultures of resting peritoneal leucocytes. Figure 7 shows that IL-10 levels were significantly lower in supernatants from old animals ($P<0.001$) when compared to mature adults, whereas extreme long-lived animals showed increased levels of IL-10 ($P<0.05$).

Discussion

By their very ability to survive well beyond average life expectancy, extremely long lived individuals of any species would be expected to have withstood the detrimental effects of the ageing process better than those individuals who do not live to extreme old age. The study of such individuals may thus provide important insights into the aging process and the processes that result in frailty in a wide range of physiological systems. The dysregulation and overall decline in the immune response with age is well documented and is evidenced by the higher risk and severity of infections and the increased susceptibility to cancer in aged subjects (Miller, 1996; Castle, 2000). The present study examined immune cell function and responses in adult mice of four different age groups, including those reaching extreme old age. The results demonstrate that peritoneal immune cells, including lymphocytes, NK cells and macrophages, from exceptionally long-lived animals preserved their function in response to stimuli and showed controlled oxidative-inflammatory status and minimal NFκB activation in resting conditions, similar to that seen in younger adults. In contrast the old and very old groups of mice showed impaired leucocyte function and increased oxidation/inflammation status, confirming previous findings of our group and others (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008a). Although this was a cross-sectional study we did monitor the life-spans of mice in the old and very old

groups and only one animal in each group reached extreme old age. Interestingly these were the only animals within this group that showed controlled basal NFκB activation in their peritoneal leucocytes. These data suggest the importance of maintaining both redox status and a low-inflammatory and NFκB activity for maintaining immune function and achieving extreme old age.

Age-related alterations in immunity have been extensively studied and T cells are considered to be exquisitely sensitive to immunosenescence (Miller, 1996; Castle, 2000; Pawelec et al., 2002). Longitudinal studies in elderly individuals have defined an immune risk phenotype (IRP) in humans, which is predictive of significantly decreased survival, and includes inversion of the CD4:CD8 ratio and a low lymphoproliferative response (Wikby et al., 2005; De la Rosa et al., 2006). T lymphocyte proliferative responsiveness to antigens or mitogens also decreases with age, as does expression of the co-stimulatory molecule CD28 and production of the T cell growth factor IL-2 (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008a; De la Fuente et al., 2008b). The lower production of IL-2 with aging has been related to a skewing of CD4 T cell responses during infection from a Th1 towards a Th2 profile (Cakman et al., 1996; Ginaldi et al., 1999a). The present work revealed that extremely long-lived mice showed preserved ConA-stimulated proliferation and increased IL-2 production, suggesting that extended longevity was associated with maintenance of immune homeostasis including a preserved Th1/Th2 profile dominance. The relevance of these data to longevity is supported by epidemiological studies in humans showing that maintenance of the lymphoproliferative response to ConA is predictive of low morbidity and mortality (De la Rosa et al., 2006).

The present study also confirms our previous data showing an effect of age on lymphocyte proliferation in response to LPS (Puerto et al., 2005), but additionally reveals that extremely the long-lived mice showed a higher proliferative capacity than the old and very old groups but lower than the adults. LPS is known to directly activate innate immune cells, such as macrophages and can also activate B cells independently of antigen. B cells also reduce their proliferative response with aging (Whisler et al., 1991; Frasca et al., 2003), but interestingly proliferative capacity can be restored to aged B cells by treatment with increased concentrations of IL-2 (Whisler et al., 1991), supporting the importance of the intact IL-2 response reported here in the extreme long-lived animals.

In addition to an intact lymphoproliferative response, extreme longevity in the mice was also associated with preserved lymphocytotoxic activity. The latter plays a central role in combating both viral infections and cancers and epidemiological data have shown that the majority of cancers occur in patients over the age of 65 years, but cancer incidence and mortality show a levelling off around the age of 85-90 years, and thereafter reach a plateau and decline (de Rijke et al., 2000). A growing literature shows the decrease of anti-tumour NK cell activity with aging (Puerto et al., 2005; De la Fuente, 2008; De la Fuente et al., 2008), in agreement with the present work. Diminished NK activity is also a well recognised element of the IRP and results in higher morbidity and mortality (De la Rosa et al., 2006). Importantly, extreme long-lived mice maintained their NK cell cytotoxic activity, a finding also reported for human centenarians (Bonafè et al., 2001; Bonafè et al., 2002).

Although phagocytes were thought to play a less critical role in the immune dysfunction occurring in the elderly, more recent investigations have shown a general decline in the function of these cells is a major reason for the increased susceptibility to bacterial and viral infections among aged subjects (Ginaldi et al., 1999a; Lord et al., 2001; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2004; De la Fuente, 2008). However, little is known of

phagocyte function in successfully aged individuals, though, decreased phagocyte function has been found to be related to shorter lifespan in old individuals in both mice and man (Niwa et al., 1989; Guayerbas et al., 2002b; Guayerbas and De la Fuente, 2003; Alonso-Fernández et al., 2008). In the present study extremely long-lived mice showed preserved macrophage phagocytic function, suggesting that preservation of this function also contributes to longevity.

Leucocyte migration was also found to be impaired in old and very old mice, confirming previous work in humans and mice (Simons and Reynolds, 1990; Guayerbas et al., 2002b; Puerto et al., 2002; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2008), whereas long-lived animals showed a well-preserved migratory function in both lymphocytes and macrophages. Recent studies have reported a decrease with age in cell signalling elicited by ligation of a wide variety of immune cell receptors, leading to alteration of the receptor-driven functions of leucocytes, including chemotactic activity (Fulop et al., 2004) and proliferative responses (Plunkett et al., 2007). Interestingly, the signalling pathways affected were also diverse and included reduced signalling through MAP kinases and PI3-kinase/AKT (Fulop et al., 2004; Fortin et al., 2007; Plunkett et al., 2007). These data suggest that the effects of aging are not receptor specific and are targeted at events proximal to the membrane receptor. In this context alterations have been found in membrane lipid raft function with age which would be expected to modify immune receptor function. For example, recruitment of the receptor TREM-1 into lipid rafts has been shown to be altered in neutrophils from older humans (Fortin et al., 2007). Increased oxidative stress is known to affect membrane fluidity, for example through increased peroxidation of lipids. The data reported here show that extreme longevity was associated with the preservation of anti-oxidant mechanisms and we propose that this would have a beneficial effect on cell signalling in leucocytes and contribute to the maintenance of a variety of functions including proliferation, migration and cytokine secretion.

Maintenance of low oxidative-inflammatory parameters was indeed observed in the leucocytes of extreme long-lived mice, which showed an increased basal catalase activity and IL-10 levels, and decreased stimulated ROS levels. Increased catalase, a potent antioxidant enzyme, and IL-10, an anti-inflammatory cytokine produced mainly by Th2 cells, could be key mechanisms in preventing endogenous damage caused by oxidative burst and chronic inflammation, leading to long-term preserved immune cell function and longevity. Although ROS production is an important mechanism of microorganism destruction, an elevated ROS response can be deleterious for leucocytes and neighbouring cells (Víctor and De la Fuente, 2003; De la Fuente, 2008). Previous studies from our group have found reduced catalase activity in leucocytes from young prematurely aging mice, which further supports the impairment of this parameter as an early driver of aging of the immune system (Alvarado et al., 2006b). Moreover, phagocytes from human centenarians have shown increased catalase activity as compared to 25-35 year old individuals (Alonso-Fernández et al., 2008) and increased catalase activity in transgenic mice can delay aging and has been found to extend both median and maximum lifespan (Cutler, 2005; Enns et al., 2008). The decrease in antioxidant defences in leucocytes from old and very old animals compared to mature adults was coincident with the increase in oxidation markers, namely enhanced oxidized glutathione content and basal XO activity. Oxidized glutathione levels in leucocytes have previously been described to be higher in old mice (Alvarado et al., 2006a), in agreement with the present results. In addition, an age-related increase in XO activity has been found in human and rat plasma (Aranda et al., 2007). In contrast, successfully aged animals showed oxidized glutathione levels and basal XO activity similar to adult

individuals. Thus, taken together, long-lived animals show a well-preserved redox state, in terms of antioxidant defences and oxidant compounds, in peritoneal leucocytes, which could be related to the well-conserved function in response to stimuli of these cells.

Immune cells are constantly exposed to sublethal doses of different aggressors which could lead to the creation of a chronic low grade inflammatory state and thereby contribute to tissue aging (Toussaint and Remacle, 1996). Indeed, the present work shows increased levels of basal TNF-α in resting leucocyte cultures from old and very old animals, whereas the basal levels of TNF-α in long-lived mice were similar to those of animals at younger ages. Increased production of inflammatory cytokines in resting cells leading to elevations of circulating proinflammatory markers, such as TNF-α, results in frailty and disability in the elderly and is associated with dementia, functional disability and high mortality risk (De Martinis et al., 2006). Moreover, gene polymorphisms located within the promoter regions of pro-inflammatory cytokines influence susceptibility to age-related diseases, by increasing gene transcription and thus cytokine production, whereas genetic variations determining production of anti-inflammatory cytokines or decreased production of pro-inflammatory cytokines have been found to be associated with successful aging (Lio et al., 2003; De Martinis et al., 2006). In a study on 190 Italian centenarians, the IL-10 – 1082/G polymorphism was demonstrated as a specific marker for longevity (Lio et al., 2002). This genotype, associated with high IL-10 production, was argued to confer an anti-inflammatory status, thus enhancing the possibility to attain extreme longevity. In addition, the IL-10 – 1082/G genotype is much less frequent in patients affected by Alzheimer's disease (De Martinis et al., 2006). The present work shows decreased levels of basal IL-10 in resting leucocyte cultures from old animals with respect to mature adults, whereas these levels were higher in extreme long-lived animals, which further supports the key role played by this cytokine in attaining longevity.

Finally, this study showed that activation of NFκB in resting peritoneal leucocytes exhibited the same profile as TNF-α secretion, increasing in old and very old individuals and being similar in long-lived animals to that of adult mice. Moreover, in the old and very old groups of mice, only subjects showing controlled basal NFκB activation in leucocytes achieved extreme longevity, which further supports the key role played by this transcription factor in aging of the immune system. NFκB is a ubiquitous transcription factor known to be activated by proinflammatory cytokines and oxidative stress, both present in the old and very old groups of animals. In turn, NFκB induces the expression of a variety of genes encoding molecules involved in the immune and inflammatory responses such as proinflammatory cytokines and adhesion molecules (Dröge, 2002; De la Fuente, 2008). Thus, activation of NFκB must be under tight control since adequate levels of NFκB activation both in basal conditions as well as in response to stimuli are essential for the adequate preservation of cell homeostasis and consequent development of a proper immune response. In contrast, persistent high NFκB activation in basal conditions could be deleterious and has been related to a wide range of aging-related diseases, such as atherosclerosis (Ginn-Pease and Whisler, 1998). In conclusion, the present work confirms that successfully aged subjects would be those who have the better capacity to adapt and deal with immunological stressors throughout life (Franceschi et al., 2000b) and indicates that controlled NFκB activation in resting leucocytes could contribute importantly to a well-preserved response to stimuli of immune cells leading to increased longevity.

Experimental Procedures

Animals

We used 44 female ICR/CD-1 mice (*Mus musculus*) purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) of different ages, namely mature adult (37±4 weeks), old (69±4 weeks), very old (92±4 weeks) and long-lived (125±4 weeks). The mice were specifically pathogen free as tested by Harlan and according to the Federation of European Laboratory Science Associations recommendations. Mice were housed at 6±1 per cage and maintained at a constant temperature (22±2 °C) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan, France), on a 12/12 h reversed light/dark cycle (lights on at 20:00 h). Mice had access to tap water and standard Sander Mus pellets (A04 diet from Panlab L.S., Barcelona, Spain) *ad libitum*. Diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. Mice were treated according to the guidelines of the European Community Council Directives (86/6091 EEC). The animals were marked for their individual follow-up.

Collection of peritoneal leucocytes

Peritoneal suspensions were collected between 08.00 and 10.00 h, to minimize circadian variations of the parameters studied, without sacrificing the animals. Mice were held by the cervical skin, the abdomen was cleansed with 70% ethanol and 3 mL of sterile Hank's solution, previously tempered at 37 °C, was injected intraperitoneally. After massaging the abdomen, 80% of the injected volume was recovered. Peritoneal leucocytes, mainly lymphocytes, macrophages and NK cells (Puerto et al., 2005) were identified by their morphology and quantified in Neubauer chambers using optical microscopy (40X). The cellular suspensions were adjusted by dilution with Hank's solution to a final concentration depending on the parameter analyzed (indicated in the corresponding method). Cellular viability, routinely checked before and after each experiment by the Trypan Blue (Sigma, St Louis, USA) exclusion test, was higher than 99 ± 1% in all cases. All incubations were performed at 37 °C in a sterile and humidified atmosphere of 5% CO₂.

Lymphocyte Proliferation

A previously described method (Alvarado et al., 2006a) was used with minor modifications. The peritoneal suspension was adjusted to 5 × 10⁵ lymphocytes/mL in complete medium containing RPMI-1640 (PAA, Pasching, Austria), 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% gentamicin (PAA, Pasching, Austria), and 200 µL were cultured in 96-well plates with lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli*, 055:B5, 1 µg/mL per well; Sigma, St. Louis, USA) or concanavalin A (ConA; 1 µg/mL per well; Sigma, St. Louis, USA) as stimulated samples or in complete medium alone as non-stimulated samples. After 48 h of incubation, 5 µL ³H-thymidine (MP Biomedicals) were added to each well (2.5 µCi/well), 100 µL of culture supernatants were collected for cytokine measurements and medium was renewed. Cells were harvested 24 h thereafter. The results were expressed as counts per minute (cpm).

Lymphocyte Chemotaxis

The chemotactic index (CI) was evaluated by the capacity of lymphocytes to migrate through a filter, with a pore diameter of 3 µm (Millipore, Madrid, Spain), included in a Boyden chamber (Boyden, 1962) and towards a chemoattractant agent (f-Met-Leu-Phe: fMLP; *Escherichia coli*; Sigma, St. Louis, USA; 10⁻⁸ M), following a method previously described (Puerto et al., 2002). After a 3 h incubation of aliquots of 300 µL of the peritoneal suspension adjusted to 5 × 10⁵ lymphocytes/mL in Hank's medium, filters were fixed and stained, and the lymphocyte CI was calculated by counting, in an

optical microscope (100X), the total number of lymphocytes in one-third of the lower face of the filters.

Cytotoxicity

Murine lymphoma YAC-1 cells were used as targets in the natural killer (NK) activity assay (Alvarado et al., 2006a). An enzymatic colorimetric test was used for cytotoxicity measurements of target cells (Cytotox 96 TM, Promega, Madison, WI, USA) based on lactate dehydrogenase determination using tetrazolium salts. Aliquots of 100 µL of peritoneal leucocytes, previously adjusted to 10^6 leucocytes/mL in RPMI 1640 without phenol red (PAA, Pasching, Austria) were cultured at an effector/target rate of 10/1 and incubated for 4 h. Thereafter, lactate dehydrogenase enzymatic activity was measured in 50 µL/well of the supernatants by addition of the enzyme substrate and absorbance recording spectrophotometrically at 490 nm. The results were expressed as percentage of lysis of target cells.

Macrophage Chemotaxis

The chemotactic capacity of macrophages was evaluated as previously described for lymphocytes, with the peritoneal suspension adjusted to 5×10^5 macrophages/mL in Hank's medium.

Macrophage Phagocytosis

Phagocytosis of inert particles (latex beads; Sigma, St. Louis, USA; diluted to 1% in phosphate-buffered saline) was carried out following a method previously described (Puerto et al., 2002). Aliquots of 200 µL of the peritoneal suspension adjusted to 5×10^5 macrophages/mL Hank's medium were incubated in migratory inhibitory factor (MIF) plates (Kartell, Noviglio, Italy) for 30 min. The adhered monolayer was washed and resuspended in 200 µL of Hank's medium plus 20 µL of latex solution. After 30 min of incubation, plates were washed, fixed and stained, and the phagocytosis was expressed as the number of latex beads ingested per 100 macrophages (Phagocytic Index; PI), which was assessed by optical microscopy (100X). The number of ingesting macrophages per 100 macrophages (Phagocytic Efficiency; PE) was also determined.

Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS levels were measured by fluorescence following a method previously described (Puerto et al., 2002) with some modifications, using the probe de-acetylated 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF-DA; Molecular Probes, Paisley, United Kingdom) which is oxidized in the cytoplasm by ROS into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), a highly fluorescent compound. Aliquots of 200 µL of the peritoneal suspension adjusted to 10^6 leucocytes/mL in Hank's medium were incubated for 30 min and 20 µL of H₂DCF-DA (1mM/well) were added to each well. After 15 min of incubation, 20 µL of phorbol-myristate-acetate (PMA; 5 ng/mL in well; Sigma, St. Louis, USA) and 20 µL of Hank's medium were added to stimulated and non-stimulated samples, respectively. Samples were incubated during 15 min and fluorescence was recorded with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm. The results were expressed as percentage of stimulation with respect to the basal value without PMA.

LPS-stimulated TNF-α and Con-A stimulated IL-2

IL-2, IL-10 and TNF-α levels were measured simultaneously by luminometry (Beadlyte mouse 21-plex cytokine detection system, Upstate, Millipore) in supernatants of peritoneal leucocytes cultured as described above. We also attempted to study the cytokines in supernatants of the peritoneal suspensions, but levels were undetectable. Aliquots of 50 µL of samples were incubated in 96-well plates with monoclonal antibodies conjugated to luminex beads 2 h in the dark at room temperature on a plate shaker. Afterwards, 25 µL of biotin solution were added to each well, followed by a 1.5 h incubation. Finally, 25 µL of streptavidin-phycoerythrin were added and incubated in

the same conditions for 30 min. After adding stop solution, vacuum manifold was applied to bottom of filter plate to remove liquid and samples were resuspended in 125 μ L of sheath fluid. The results were read by luminometer (TNF- α , bead 6; IL-2 bead 21; IL-10, bead 36) and expressed as pg/mL. Sensitivity for IL-2, IL-10 and TNF- α was 0.3, 2.9 and 0.5 pg/mL, respectively. Range of detection was 6.9-5000 pg/mL for all three cytokines.

Oxidized Glutathione (GSSG)

Total glutathione (GSH) as well as its oxidized form were assayed by the enzymatic recycling method of Tietze (1969), with some modifications (Alvarado et al., 2006b), by monitoring the change in absorbance at 412 nm. Briefly, aliquots of 1 mL of the peritoneal suspension (10^6 cells/mL Hank's medium) were centrifuged at 1200 g for 10 min at 4°C. Pelleted cells were resuspended in previously degassed media, containing 5% of trichloroacetic acid (TCA) in HCl 0.01 N for GSH measurements, and phosphated buffer 50mM pH 7.0 plus ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA, 1 mM) (Sigma, St. Louis, USA) and *N*-ethylmaleimide (NEM, 12.5 mM) (Sigma, St. Louis, USA) to block reduced GSH for samples aimed to measure GSSG. Then, samples were sonicated and centrifuged at 3200 g for 5 min at 4°C. Aliquots of supernatants of immune cells were measured using in the reaction mixture: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 6 mM) (Sigma, St. Louis, USA), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (β -NADPH, 0.3 mM) (Sigma, St. Louis, USA) and glutathione reductase (GR, 10 U/ml) (Sigma, St. Louis, USA). The reaction was monitored during 240 s or 140 s for GSH or GSSG determinations, respectively, and the results were expressed as nmol/ 10^6 cells.

Xanthine Oxidase (XO)

Xanthine oxidase activity was determined by fluorescence (Amplex Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay Kit, Molecular Probes, Paisley, United Kingdom) in 50 μ L of the peritoneal suspension adjusted to 10^6 leucocytes/mL Hank's medium. In the assay, XO catalyzes the oxidation of purine bases (xanthine) to uric acid and superoxide. This superoxide spontaneously degrades in the reaction mixture to H₂O₂, which in the presence of horseradish peroxidase (HRP), reacts stoichiometrically with Amplex Red reagent to generate the red-fluorescent oxidation product, resorufin. Resorufin has fluorescence emission maxima of 585 nm and a high extinction coefficient ($54000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). After 30 min of incubation, measurement of fluorescence was performed in a microplate reader using excitation at 530 nm and emission detection at 595 nm. Levels as low as 0.1 mU/mL of XO can be detected. Protein content of the same samples was evaluated following Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit protocol (Sigma, St. Louis, USA), which is similar to the Lowry procedure in that both rely on the formation of a Cu²⁺-protein complex under alkaline conditions, followed by the reduction of the Cu²⁺ to Cu¹⁺. The amount of reduction is proportional to the protein present. BCA forms a purple-blue complex with Cu¹⁺ in alkaline environments, thus providing a basis to monitor the reduction of alkaline Cu²⁺ by proteins, measuring absorbance in the 560 nm region after a 30 min incubation. The results were expressed as international miliunits (mU) of enzymatic activity per mg of protein.

Nuclear Factor κ B (NF κ B) activation

Nuclear and cytoplasmic extracts were isolated as previously described (Lernbecher et al., 1993) and frozen at -80°C until used in electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). The EMSAs were performed as previously described by Tato et al. (2006). Briefly, double-stranded oligodeoxynucleotides corresponding to the palindromic κ B site (5'-GGGAATTCCC-3'; MWG-Biotech AG) were labelled by filling the overlapping ends with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Invitrogen, Paisley,

United Kingdom) and [³²P]dCTP (Amersham Biosciences). Unincorporated nucleotides were removed and labelled oligonucleotide (100 000 counts per minute) was incubated with 15 µg nuclear protein extract (measured by BCA Protein Assay Kit, Sigma, St. Louis, USA) and 2 µg poly(dI-dC) (Amersham Biosciences) in buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 17% glycerol and, just before use, 1 mM dithiothreitol (Sigma, St. Louis, USA) and 0.7 mM phenylmethylsulphonylfluoride (Sigma, St. Louis, USA) added, in a final volume of 23 µL for 15 min at 20 °C. Complexes were separated on 5.5% polyacrylamide gels run on 0.25% Tris-borate-EDTA. Gels were dried and exposed to Photoimager. Bands were analyzed by ImageQuant Program. The results were expressed as Densitometry Arbitrary Units (AU).

Antioxidant enzymes

The peritoneal suspension was adjusted to 10⁶ leucocytes/mL in Hank's medium and aliquots of 1 mL were used to perform the enzymatic assays. The cells were centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 °C, and the pellets were resuspended in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 previously degassed. Thereafter, the samples were sonicated and centrifuged at 3200 g for 20 min at 4 °C. Glutathione Peroxidase (GPx) enzyme activity was measured using the original technique described by Lawrence and Burk (1976) with some modifications (Alvarado et al., 2006b). This method is based on the oxidation of glutathione in the presence of cumene hydroperoxide (0.71 mM in phosphate buffer) (Sigma, St. Louis, USA) by GPx. A reaction solution was used, containing GSH (4 mM) (Sigma, St. Louis, USA), GR (1 U/mL) (Sigma, St. Louis, USA), β-NADPH (0.2 mM) (Sigma, St. Louis, USA), EDTA (1 mM) (Sigma, St. Louis, USA) and sodium azide (4 mM) (Sigma, St. Louis, USA). The reaction was followed spectrophotometrically during 300 s by the decrease of the absorbance at 340 nm due to NADPH oxidation. The results were expressed as mU of enzymatic activity per 10⁶ cells. Catalase (CAT) activity was determined following the method described by Beers and Sizier (1952) with slight modifications previously introduced by us (Alvarado et al., 2006b). The enzymatic assay was followed spectrophotometrically for 80 s at 240 nm through the decomposition of H₂O₂ (14 mM in phosphate buffer) into H₂O + O₂. The results were expressed as International Units (U) of enzymatic activity per 10⁶ cells.

Statistical Analysis

The data are expressed as mean ± standard error (SE). The normality of the samples and the homogeneity of variances were checked by the Kolmogorov-Smirnov and Levene analyses, respectively. Differences due to age were studied through the one-way analysis of variance (ANOVA). The Tukey test with a level of significance set at *P*<0.05 was used for post hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas its counterpart analysis Games-Howell set at the same significance level was used with unequal variances.

Acknowledgments

This work was supported by MEC (BFU2005-06777, SAF2006-13642). We would like to thank John S. Curnow for his technical advice with luminometry assays.

Figure legends

Figure 1. (A) Proliferation in 48 h cultures in basal, and LPS and concanavalin A stimulated conditions (cpm), (B) chemotaxis index (number of lymphocytes), and (C) NK activity (percentage of lysis of tumour cells), of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and extreme long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate or triplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 2. (A) Chemotaxis index (number of macrophages), (B) macrophage phagocytic index (number of latex beads per 100 macrophages), (C) macrophage phagocytic efficiency (number of phagocytic macrophages per 100 macrophages), and (D) ROS levels (percentage of stimulation in response to phorbol-myristate-acetate), of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and extreme long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate or triplicate assays. *** P <.001, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 3. (A) LPS-stimulated TNF- α (pg/mL), and (B) Con A-stimulated IL-2 (pg/mL) levels, in 48 h cultures of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and extreme long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 4. (A) Oxidized glutathione (nmol/10⁶ leucocytes \times 10⁻³), and (B) xanthine oxidase activity (mU/mg protein) of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and extreme long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate or triplicate assays. ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 5. (A) Total glutathione (nmol/10⁶ leucocytes), (B) glutathione peroxidase activity (mU/10⁶ leucocytes), and (C) catalase activity (U/10⁶ leucocytes) of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and extreme long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate or triplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 6. (A) Upper panel - NFκB activation in nuclear extracts of peritoneal leucocytes (Densitometry Arbitrary Units); and lower panel - representative EMSAs showing NFκB-DNA complexes; the old and very old subjects corresponding to the bands marked with arrows were the only subjects from their age groups achieving extreme longevity. (B) basal TNF- α levels (pg/mL) in 48 h cultures of peritoneal leucocytes from mature adult (MA), old (O), very old (VO) and extreme long-lived (L) female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 7. Basal IL-10 levels (pg/mL) in 48 h cultures of peritoneal leucocytes from mature adult, old, very old and long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figures

Figure 1

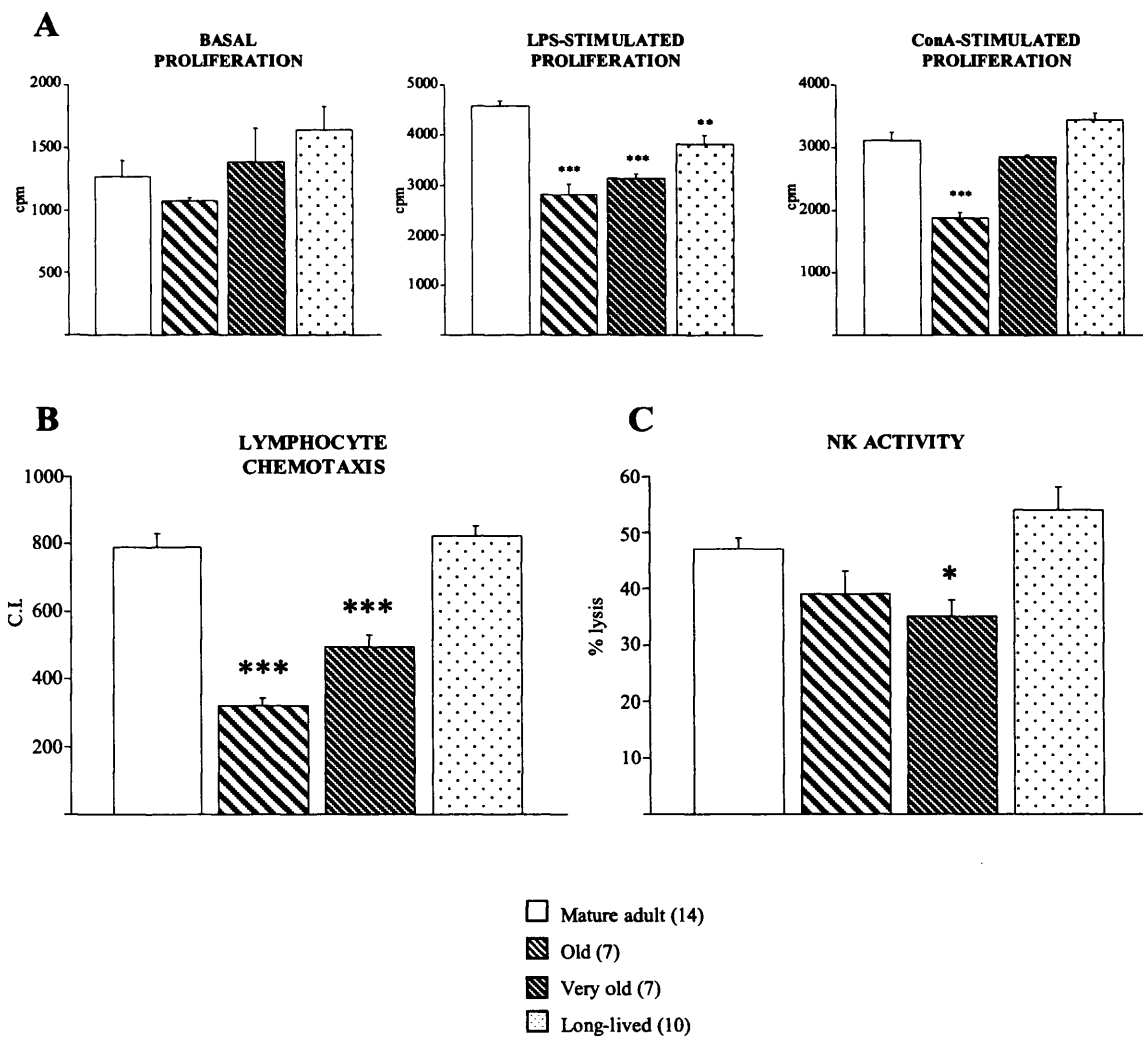


Figure 2

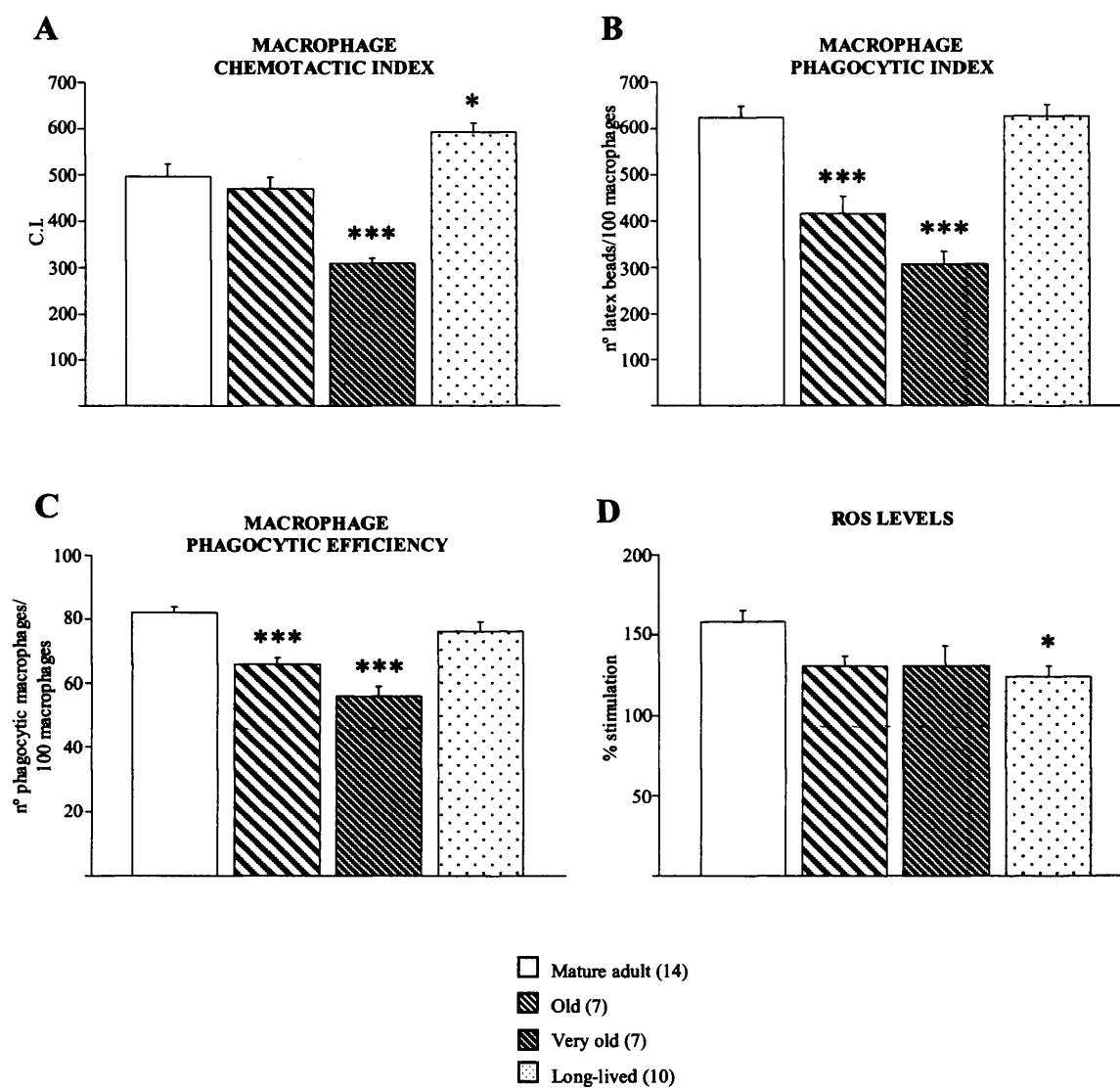


Figure 3

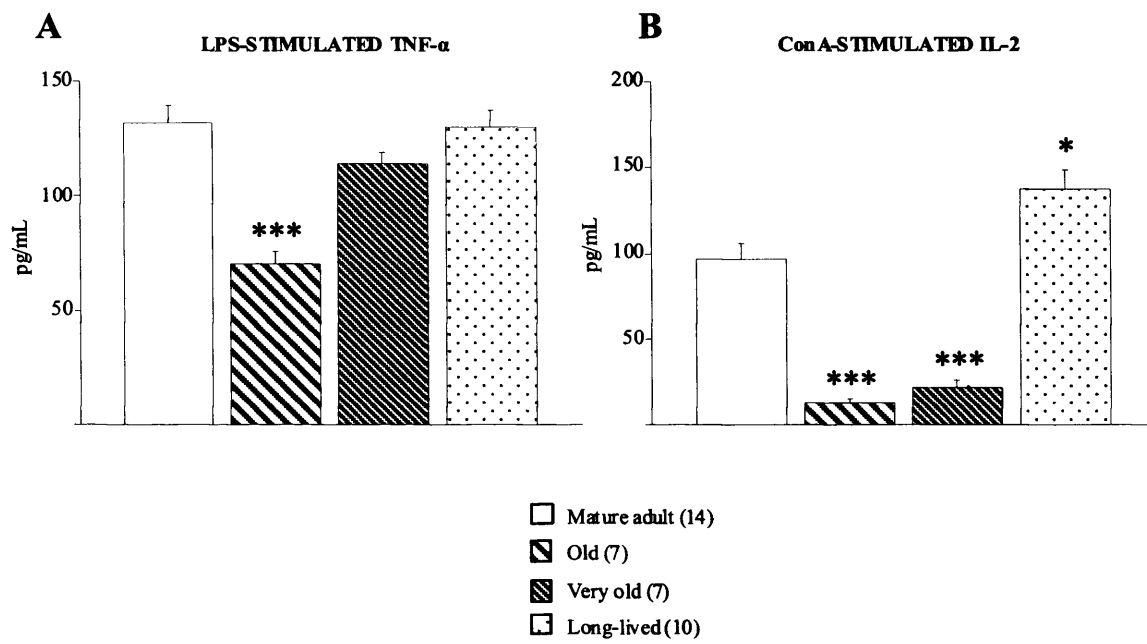


Figure 4

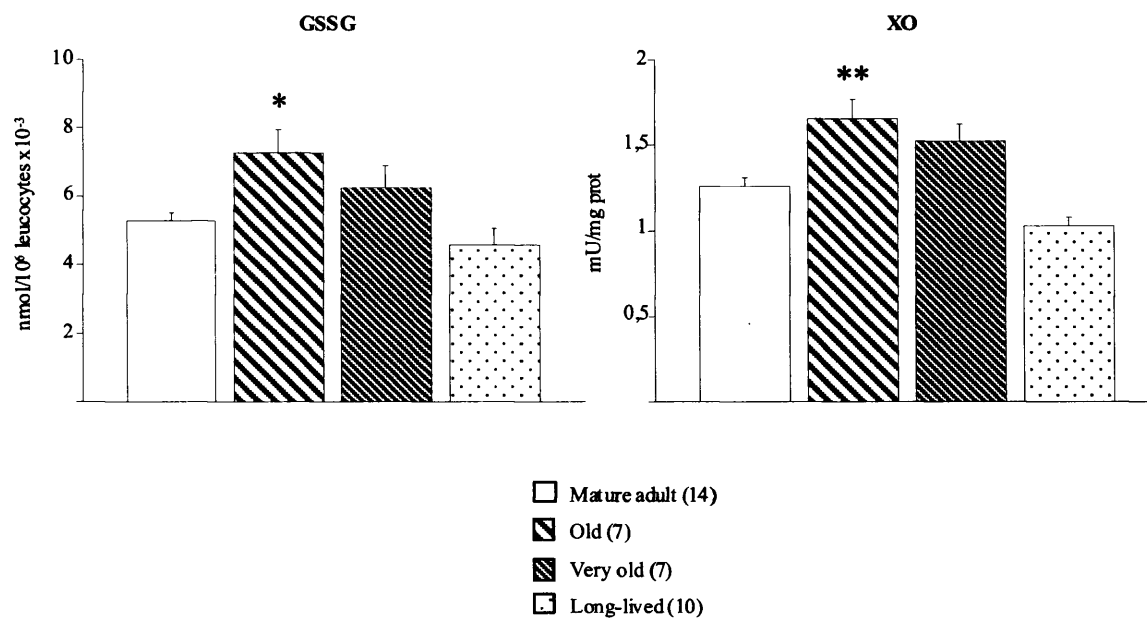


Figure 5

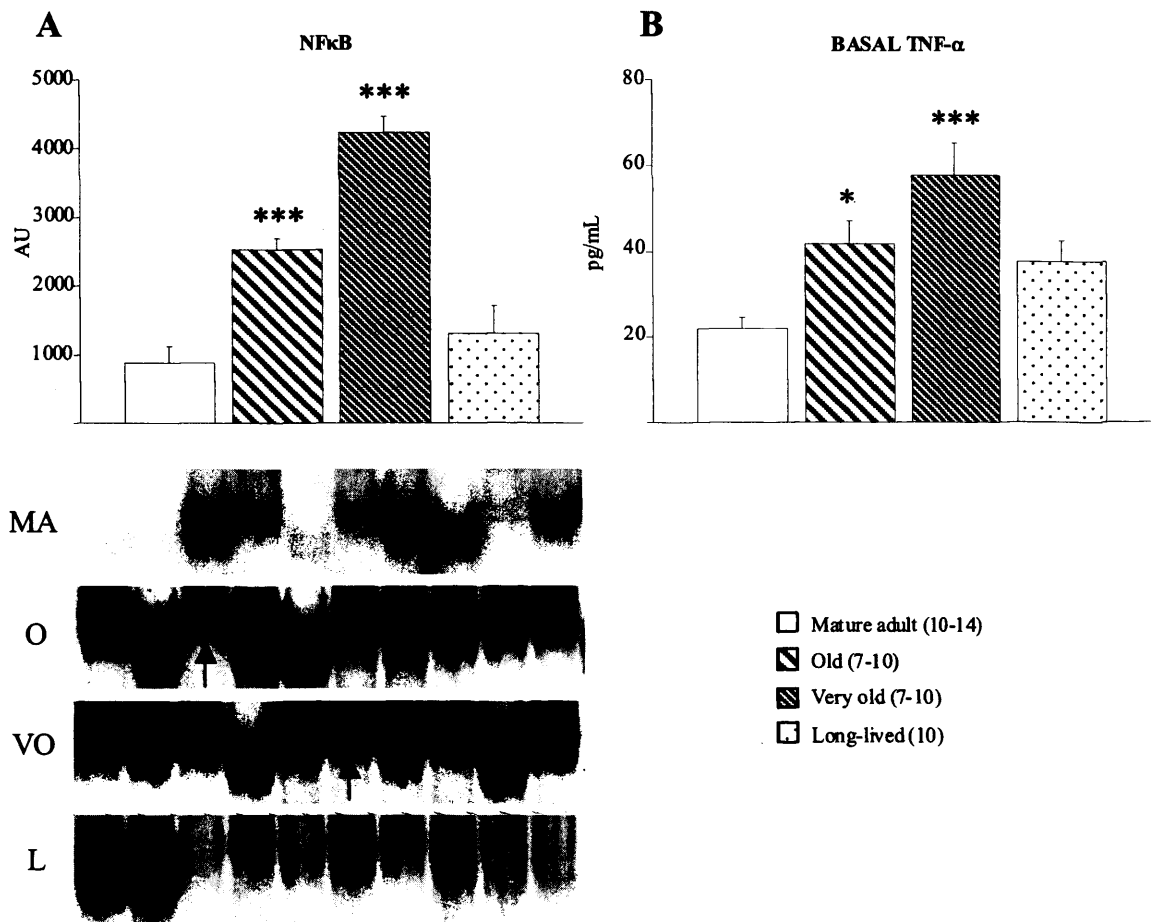


Figure 6

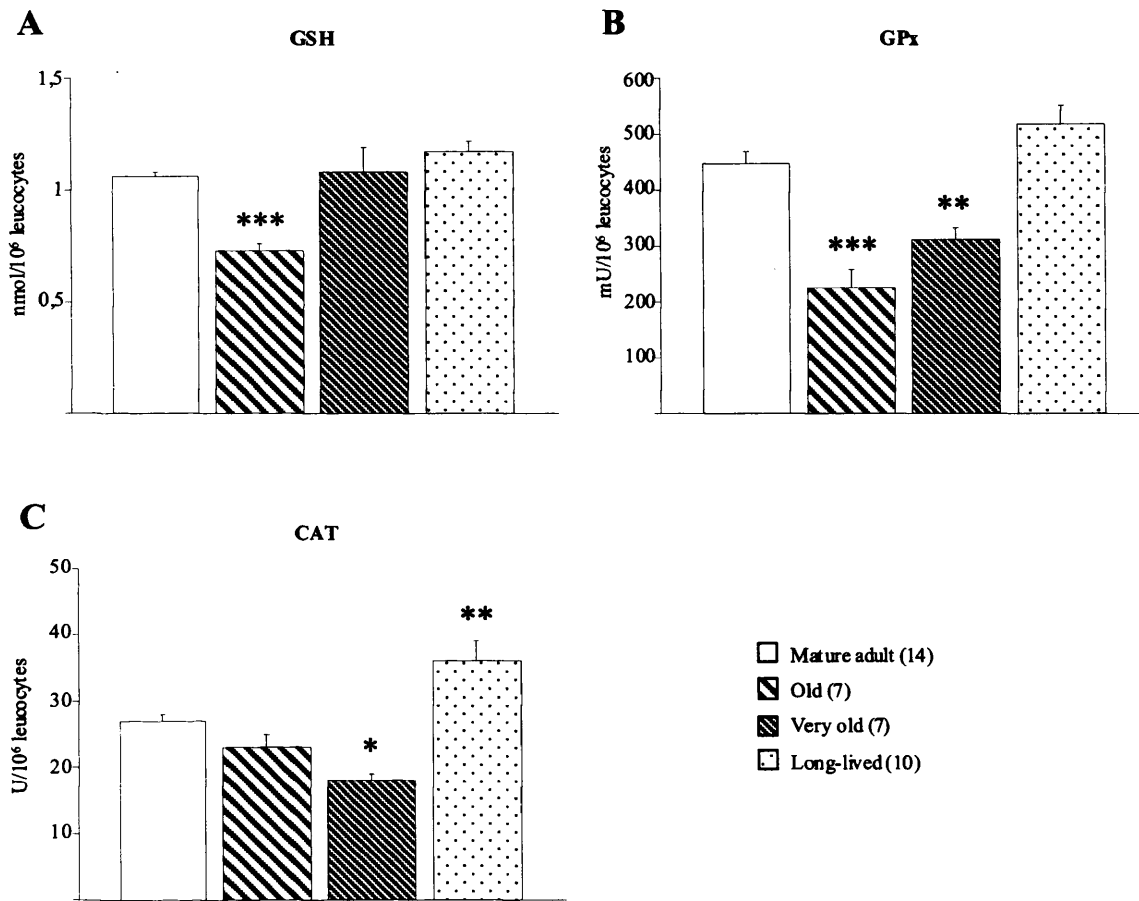
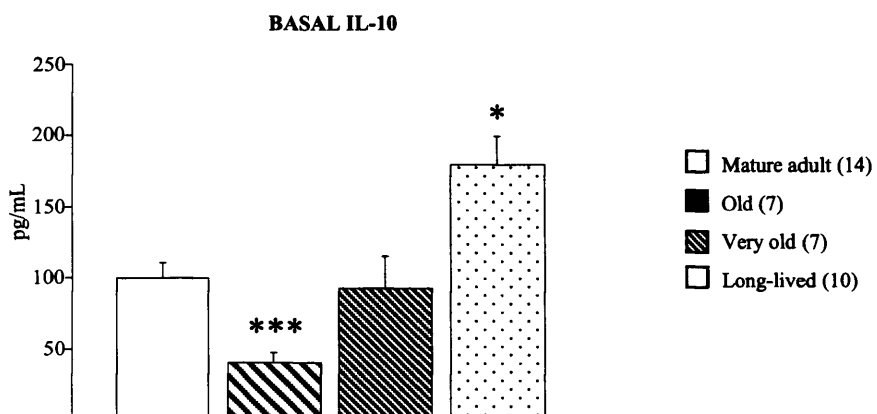


Figure 7



Low chronic inflammatory status and preserved Th1/Th2 cytokine responses in naturally long-living mice

Lorena Arranz ^{*}, Janet M. Lord [†] and Mónica De la Fuente ^{*}

^{*} Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biological Sciences,
Madrid Complutense University, Madrid, Spain.

[†] Division of Immunity and Infection, MRC Centre for Immune Regulation,
Birmingham University Medical School, Birmingham, United Kingdom.

Corresponding author: Mónica De la Fuente. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. Telephone number: 00 34 91 394 49 89. Fax number: 00 34 91 394 49 35. e-mail address: mondelaf@bio.ucm.es.

Running title: Cytokines in aging and longevity

Key words: Aging, cytokines, longevity, peritoneal leucocytes.

Abstract

Alterations in immunity along with the aging process whereas preservation of immune function in subjects that have achieved longevity have been well established. Given that cytokines are major modulators of immune responses, it is of great interest to study the cytokine network both in aging and longevity. In the present work, we used ICR (CD1) female mice of different ages, namely mature adult (44 ± 4 weeks), old (69 ± 4), late old (92 ± 4) and very long-lived (125 ± 4). Peritoneal leucocytes were collected and cultured under basal, and Con A- and LPS- stimulated conditions. In each supernatant, levels of 21 different cytokines were measured by luminometry. These included regulatory cytokines and growth factors (IL-2, IL-5, IL-9, IL-17, GM-CSF, VEGF), proinflammatory (IL-1 α / IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12 (p40) / IL-12 (p70), IFN- γ , TNF- α) and antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13), and chemokines (KC, MCP-1, MIP-1 β , RANTES). Chronic low grade inflammation in old age is shown by increased basal levels of cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-12 (p70) and TNF- α , and decreased IL-10. Under LPS- and Con A- stimulated conditions, the results show profound cytokine alterations in the old and late old subjects as compared to the mature adults. Conversely, long-lived individuals preserve in general the adult-like cytokine profile, with some exceptions, such as increased basal IL-10 levels. These stand out as early longevity markers, leading to controlled basal inflammation. Furthermore, maintenance of Th1/Th2 cytokine profile under stimulated conditions seems to be a key mechanism for the preserved immune response reported in very long-lived individuals, and thus for achieving longevity.

Introduction

The disruption and overall impairment in host immunity that occur along with the aging process are evidenced by the higher risk and severity of infections and the increased susceptibility to cancer among aged subjects (Miller, 1996; Castle, 2000), which exert a great influence on age-related morbidity and mortality (Wayne et al., 1990). Indeed, several age-related changes in immune functions have been shown to correlate with increased mortality, such as low lymphoproliferative response to mitogens and NK cytotoxicity, defining the immune risk phenotype in man (Wikby et al., 2005; De la Rosa et al., 2006). However, centenarians and exceptionally long-lived mice seem to exhibit a high degree of preservation of those immune functions, which may be essential to reach very advanced age in healthy condition (Franceschi et al., 1995; Alonso-Fernández et al., 2008) and suggests maintenance of adequate immune function with aging as a positive health and longevity marker (Wayne et al., 1990; De la Fuente and Miquel, 2009).

Among studies on the immune system in aging and longevity, of especial interest are those using non-invasive sample obtaining, which allows subsequent follow up of individuals under study, as well as those using whole sample assays, which better approach *ex vivo* to the real physiological response *in vivo*. Peritoneal leucocyte suspension represents an easy access to this kind of sample in mice. Moreover, peritoneal leucocytes of aged mice have been shown to be impaired in several of their functions, which has been related to increased morbidity and mortality of the subjects (Guayerbas and De la Fuente, 2003), whereas preserved responses have been found in long-living mice (Puerto et al., 2005; Arranz et al., 2009a).

Cytokines are major mediators of the complex interactions among immune cells, being responsible for development of proper immune responses. However, aging is characterized by chronic low-grade inflammatory status, so-called 'inflammaging' (Franceschi and Bonafè, 2003; De Martinis et al., 2006). Indeed, increased production of inflammatory cytokines in resting cells leading to elevations of circulating proinflammatory markers, such as TNF- α , results in frailty and disability in the elderly and is associated with dementia, functional disability and high mortality risk (Mooradian et al. 1991; De Martinis et al., 2006). In contrast, skewing of CD4 T cell responses during infection towards the Th2 profile has been well established in the elderly (Lord et al., 2001). In this regard, it has been shown that human subjects who at age 85 years produce low LPS-induced TNF- α levels have a more than 2-fold increased overall mortality risk compared to peers with a higher production (van den Biggelaar et al., 2004). Furthermore, coincident with the decreased age-related lymphoproliferative responsiveness to antigens or mitogens, decline of the T cell growth factor IL-2 has been described (Guayerbas et al., 2002a; Pawellec et al., 2002; De la Fuente et al., 2008). Crucially, studies on human centenarians have focussed on one or few parameters, losing the overall picture. In spite that this limitation can be avoided by use of long-living rodents, research on these animals has been very scarce so far. In this context, it is of great interest to study the cytokine network in mice that have achieved exceptional longevity, which might help understand healthy aging of the immune system.

In view of the above, the aim of the present work was to study the levels of a whole panel of Th1/Th2 cytokines, regulatory cytokines and growth factors as well as chemokines in both resting and stimulated peritoneal leucocytes, throughout the aging process, including long-lived subjects. With that purpose, we used ICR/CD1 female mice of different ages, i.e. mature adult (44 \pm 4 weeks), old (69 \pm 4 weeks), very old (92 \pm 4 weeks) and long-lived (125 \pm 4 weeks). The latter had achieved healthy and successful aging since the average lifespan for females of ICR/CD1 mice strain in our animal house is 91.9 \pm 5.6 weeks (Guayerbas et al., 2002b).

Materials and Methods

Animals

We used 38 female ICR/CD-1 mice (*Mus musculus*) purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) of different ages, namely mature adult (44 \pm 4 weeks, n=14), old (69 \pm 4 weeks, n=7), late old (92 \pm 4 weeks, n=7) and long-lived (125 \pm 4 weeks, n=10). The mice were specifically pathogen free as tested by Harlan and according to the Federation of European Laboratory Science Associations recommendations. They were housed 6 \pm 1 per cage (polyurethane boxes) and maintained at a constant temperature (22 \pm 2 °C) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (FluFrance, Cachan, France), on a 12/12 h reversed light/dark cycle (lights on at 20:00 h). Mice were fed tap water and standard Sander Mus (A04 diet from Panlab L.S., Barcelona, Spain) pellet *ad libitum*. Diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. Mice were treated according to the guidelines of the European Community Council Directives (86/6091 EEC). The animals were marked for their individual follow-up.

Collection of peritoneal leucocytes

Peritoneal suspensions were collected between 08.00 and 10.00 h, to minimize circadian variations on immune system, without sacrificing the animals. Mice were held by the

cervical skin, the abdomen was cleansed with 70% ethanol and 3 mL of sterile Hank's solution, previously tempered at 37 °C, was injected intraperitoneally. After massaging the abdomen, 80% of the injected volume was recovered. Lymphocytes from peritoneal suspensions (mainly formed by lymphocytes, macrophages, NK and dendritic cells; Puerto et al., 2005; Arranz et al., 2009b) were identified by their morphology and quantified in Neubauer chambers using optical microscopy (40X). The cellular suspensions were adjusted to 5×10^5 lymphocytes/mL in complete medium containing RPMI-1640 (PAA, Pasching, Austria), 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% gentamicin (PAA, Pasching, Austria). Cellular viability was checked by the Trypan Blue (Sigma, St Louis, USA) exclusion test, and only suspensions with cell viability higher than $99 \pm 1\%$ were used for experiments.

Cytokine measurement

A previously described method (Alvarado et al., 2006a) was used with minor modifications. Immediately after adjustment of peritoneal suspensions to 5×10^5 lymphocytes/mL in complete medium, 200 μ L were cultured in 96-well plates with LPS (*Escherichia coli*, 055:B5, 1 μ g/mL per well; Sigma, St. Louis, USA) or Con A (1 μ g/mL per well; Sigma, St. Louis, USA) as stimulated samples or in complete medium alone as non-stimulated samples. After 48 h of incubation at 37 °C in a sterile and humidified atmosphere of 5% CO₂, 100 μ L of culture supernatants were collected for cytokine measurements.

Cytokine levels, including regulatory cytokines and growth factors (IL-2, IL-5, IL-9, IL-17, GM-CSF, VEGF), proinflammatory (IL-1 α / IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12 (p40) / IL-12 (p70), IFN- γ , TNF- α) and antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13), and chemokines (KC, MCP-1, MIP-1 β , RANTES), were measured simultaneously by luminometry (Beadlyte mouse 21-plex cytokine detection system, Upstate, Millipore). Briefly, aliquots of 50 μ L of samples were incubated in 96-well plates with monoclonal antibodies conjugated with luminex beads 2 h in the dark at room temperature on a plate shaker. Afterwards, 25 μ L of biotin solution were added to each well, followed by a 1.5 h incubation. Finally, 25 μ L of streptavidin-phycoerythrin were added and incubated in the same conditions for 30 min. After adding stop solution, vacuum manifold was applied to bottom of filter plate to remove liquid and samples were resuspended in 125 μ L of sheath fluid. The results were read by luminometer and expressed as pg/mL.

Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm standard error (SE). The normality of the samples and the homogeneity of variances were checked by the Kolmogorov-Smirnov and Levene analyses, respectively. Age-related differences were studied through ANOVA. The Tukey test with a level of significance set at $P < 0.05$ was used for post hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas its counterpart analysis Games-Howell set at the same significance level was used in case of unequal variances.

Results

Pro-inflammatory Cytokines

Levels of pro-inflammatory cytokines in basal, LPS- and Con A-stimulated peritoneal leucocyte culture supernatants from mature adult, old, late old and long-lived animals are shown in figure 1 (IL-1 α / β , IL-3, IL-6, IL-12 p40 / p70, IFN- γ , TNF- α). In general, values of pro-inflammatory cytokines found in the long-lived were close to the levels

observed in adults, whilst remarkable alterations were exhibited by old and late old animals.

In resting conditions, no significant differences were found on IL-1 α levels (Fig. 1A) between any older group and the adults. However, old animals showed increased levels of IL-1 β (Fig. 1B) and IL-6 (Fig. 1D) ($P<0,001$) with respect to the adults. As regards late old animals, IL-1 β (Fig. 1B) also appeared to be increased when compared to the adult group ($P<0,001$). Additionally, these animals showed higher basal IL-3 levels (Fig. 1C; $P<0,01$). Similar values of IL-1 β , IL-3 and IL-6 (Fig. 1B-D) were observed in adult and long-lived subjects. Moreover, though resting IL-12 p40 subunit concentration (Fig. 1E) was found to be increased in long-living mice as compared to the adults ($P<0,05$), active IL-12 p70 heterodimer levels (Fig. 1F) were similar for both age groups. However, basal IL-12 p70 was higher in old than in adult animals (Fig. 1F; $P<0,05$). Late old individuals showed increased basal IFN- γ (Fig. 1G; $P<0,05$), whereas resting TNF- α levels (Fig. 1H) were found to be higher both in old ($P<0,05$) and especially in late old animals ($P<0,001$) as compared to the adults. Nevertheless, long-living and adult subjects showed similar basal values of IFN- γ and TNF- α (Fig. 1G, H).

In LPS-stimulated samples, old subjects showed increased values of IL-1 β (Fig. 1B) with respect to the adults ($P<0,05$), and late old animals exhibited higher IL-1 β and also IL- α (Fig. 1B, A) ($P<0,05$ and $P<0,01$, respectively). No differences were observed as regard LPS-stimulated concentration of IL-3 and IL-12 p70 between any age group studied and the adult group (Fig. 1C, F). Again, long-lived subjects showed higher IL-12 p40 than the adults ($P<0,05$; Fig. 1E). Interestingly, both old and late old subjects showed decreased values for IL-6 (Fig. 1D; $P<0,01$). Moreover, LPS-stimulated IFN- γ (Fig. 1G) and TNF- α (Fig. 1H) levels appeared to be lower in old than in adult animals ($P<0,01$ and $P<0,001$, respectively). Long-lived individuals showed adult-like LPS-stimulated levels of all proinflammatory cytokines (IL- α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α) measured (Fig. 1A-D, F-H).

In regard to Con A-stimulated pro-inflammatory cytokine levels, IL-1 α (Fig. 1A) was found to be lower in old animals when compared to the adult group ($P<0,05$), whereas the levels of this cytokine were increased in the late old group ($P<0,05$). IL-1 β levels (Fig. 1B) were also higher in this age group ($P<0,05$). IL-3 ($P<0,01$), IL-6, IL-12 p70 ($P<0,05$), IFN- γ and TNF- α ($P<0,01$) levels were lower in old animals when compared to the adults (Fig. 1C, D, F-H). Additionally, Con A-stimulated IL-3 values were found to be decreased in late old than in adult subjects (Fig. 1C; $P<0,05$). Long-living subjects showed similar levels to the adults of all pro-inflammatory cytokines measured under Con A-stimulated conditions, with the exception of IL-12 p40 ($P<0,01$) (Fig. 1).

Anti-inflammatory Cytokines

IL-4, IL-10 and IL-13 levels in resting and stimulated leucocyte culture supernatants throughout aging in mice are shown in figure 2. In general, long-lived animals showed levels of anti-inflammatory cytokines more similar to the adults than old and late old subjects, which exhibited lower values.

In basal conditions, no differences were found for IL-4 (Fig. 2A), whereas IL-10 (Fig. 2B) appeared to be remarkably decreased in old subjects as compared to the adults ($P<0,001$). Conversely, long-living animals showed increased levels of this anti-inflammatory cytokine than the adult-mature group ($P<0,05$). Finally, resting levels of IL-13 (Fig. 2C) were higher both in old ($P<0,01$) and especially in long-living subjects ($P<0,001$) with respect to mature adults.

IL-4 and IL-10 response to LPS (Fig. 2A, B) was lower in old animals as compared to the adults ($P<0,001$ and $P<0,05$, respectively). Con A-induced levels of IL-10 (Fig. 2B) were also diminished in the old ($P<0,001$). However, IL-4 and IL-10 response to both

stimuli was preserved in the long-lived in comparison to the adults, whereas IL-13 induced levels were higher in long-living subjects ($P < 0,001$ in response to LPS; $P < 0,05$ to Con A) (Fig. 2C). In contrast, Con A-stimulated levels of IL-13 were lower in old ($P < 0,01$) and late old ($P < 0,05$) subjects with respect to the adults.

Regulatory Cytokines and Growth Factors

Levels of regulatory cytokines and growth factors in basal, LPS- and Con A-stimulated peritoneal leucocyte culture supernatants from mature adult, old, late old and long-lived animals are shown in figure 3 (IL-2, IL-5, IL-9, IL-17, GM-CSF, VEGF). The remarkable impairment of Con A-stimulated IL-2 levels shown by old and late old subjects ($P < 0,001$) as compared to the adults, is not found in long-living subjects, which in contrast show increased values of this T cell growth factor both in Con A-stimulated ($P < 0,05$) and under resting conditions ($P < 0,01$) (Fig. 3A). Late old animals also show decreased levels of IL-5 in basal ($P < 0,001$) and Con A-stimulated conditions ($P < 0,05$), whereas these levels seem to be preserved in the long-lived (Fig. 3B). Conversely, long-living rodents show increased levels of IL-9 ($P < 0,01$) in resting cultures (Fig. 3C). Basal IL-17 appeared to be decreased in all the older groups ($P < 0,001$ for late old; $P < 0,01$ for old and long-living subjects), whereas IL-17 levels in response to LPS were impaired only in the old group ($P < 0,05$) (Fig. 3D). Con A-induced GM-CSF response was higher in the long-lived ($P < 0,05$) (Fig. 3E), whereas LPS-stimulated VEGF response was increased in late old animals ($P < 0,001$) (Fig. 3F).

Chemokines

Levels of chemokines in basal, LPS- and Con A-stimulated peritoneal leucocyte culture supernatants from mature adult, old, late old and long-lived animals are shown in figure 4 (KC, MCP-1, MIP-1 β , RANTES). In general, chemokines values decreased in the old age, also in the long-lived.

Most remarkable chemokine-related changes along with the aging process in resting cultures included diminished levels of KC and MIP-1 β for both late old ($P < 0,001$ and $P < 0,05$, respectively) and long-living rodents ($P < 0,001$ and $P < 0,05$, respectively) as compared to mature adults (Fig. 4A, C).

In response to LPS, all the older groups showed impaired levels of MIP-1 β ($P < 0,001$) and RANTES ($P < 0,001$ for old and late old; $P < 0,01$ for long-living subjects) as compared to the adults (Fig. 4C, D). LPS-induced levels of KC were decreased in late old individuals ($P < 0,001$), whereas old animals showed declined levels of MCP-1 ($P < 0,05$) (Fig. 4A, B). In contrast, LPS-stimulated levels of these chemokines were found to be preserved in long-lived specimens.

As regards Con A-induced chemokine response, all the older groups showed impaired levels of KC ($P < 0,05$) as compared to the adults (Fig. 4A). Con A-induced levels of MCP-1 were lower in old individuals ($P < 0,05$), whereas both old ($P < 0,01$) and late old ($P < 0,05$) animals showed declined levels of MIP-1 β (Fig. 4B, C). In contrast, Con A-stimulated levels of these chemokines were found to be preserved in long-lived specimens.

Discussion

This is the first study which analyses the changes in the levels of a whole panel of immune mediators both in aging and longevity as well as under resting and stimulated conditions. The results described here show chronic low grade inflammation in old age by means of increased basal levels of cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-12 (p70), IFN- γ and TNF- α , and decreased IL-10. This could be related to the profound cytokine

alterations under stimulated conditions shown by the old and late old subjects studied in the present work as compared to the mature adults, which could contribute importantly to the impaired immune responses described in aged subjects (Miller, 1996; Castle, 2000). Conversely, long-lived individuals preserve in general the adult-like cytokine profile, with few exceptions, such as increased basal IL-10 levels, which stand out as early longevity markers, leading to controlled basal inflammation. Interestingly, low resting inflammation seems to correlate with adequate inflammatory responses towards immune stimuli, which mimic infection *ex vivo*. This maintenance of the Th1/Th2 cytokine profile under stimulated conditions stands out a key mechanism for the preserved immune response reported in very long-lived individuals (Franceschi et al., 1995; Puerto et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2009a), and thus for attaining longevity.

Based on the continuous exposure of immune cells to sublethal doses of a wide range of aggressors throughout life, several authors have suggested a chronic low grade inflammation status influencing the aging rate of these cells and neighbouring cells and tissues (Toussaint and Remacle, 1996; Franceschi and Bonafè, 2003; De Martinis et al., 2006). However, up to date, studies had focussed on age-related changes in just one inflammatory mediator such as IL-1 β , IL-6 or TNF- α (De Martinis et al., 2006; Cederholm et al., 2007; Di Bona et al., 2009). The present work shows elevated basal load of the great majority of proinflammatory cytokines measured, i.e. IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12 p70, IFN- γ and TNF- α , in non-stimulated cultures of peritoneal leucocytes from old and late old animals when compared to the adults. We also show that long-lived animals preserve intact adult-like proinflammatory cytokine profile. IL-12 p40 represents the exception, since it is increased in the long-lived as compared to mature adults, the latter showing similar values to old subjects. However, the biological relevance of this feature might be quite limited since IL-12 p40 is the soluble receptor and the active heterodimer IL-12 p70 is actually preserved in the long-lived whilst increased in the elderly when compared to the adults.

Human studies have previously evidenced that high production of TNF- α leading to increased basal circulating levels results in frailty and disability in the elderly and correlates with dementia, functional disability and elevated mortality risk (De Martinis et al., 2006). In a study performed on 129 patients of an old people's home, detectable serum levels of TNF- α associated with death in less than 13 months (Mooradian et al., 1991). Moreover, TNF- α has been related to age-related diseases, such as Alzheimer's disease and stroke (Franceschi et al., 2001; De Martinis et al., 2006). TNF- α and related cytokines determine strength, effectiveness and duration of inflammatory responses, whereas IL-10 and other anti-inflammatory cytokines have the opposing role, limiting and terminating inflammation (Lio et al., 2003). Thus, the basal high levels of proinflammatory cytokines shown by aged subjects in the present work could be noxious, whereas basal high concentrations of anti-inflammatory mediators could have beneficial effects.

In this context, it has been described that gene polymorphisms located within the promoter regions of proinflammatory cytokines influence vulnerability to age-related diseases, by increasing gene transcription and thus cytokine production, whereas genetic variations determining production of anti-inflammatory cytokines or decreased production of proinflammatory cytokines have been found to be associated with successful aging and longevity (Lio et al., 2002; 2003; De Martinis et al., 2006). More concretely, genotypes associated to elevated production of IL-1 β have been related to decreased survival in men (Cederholm et al., 2007). Conversely, studies on Italian centenarians have shown a negative relation between genotypes leading to increased

levels of IL-6 and longevity, and thus homozygotes with high IL-6 production have 2-fold decreased probability of achieving longevity than heterozygotes or homozygotes with low production of this cytokine (Di Bona et al., 2009). Moreover, a study performed on 190 Italian centenarians evidenced that IL-10 – 1082/G polymorphism, associated with high levels of IL-10, which confer an anti-inflammatory status, is a specific marker of longevity (Lio et al., 2002). Furthermore, IL-10 – 1082/G genotype is much less frequent in patients of Alzheimer (De Martinis et al., 2006). Indeed, the present work shows decreased levels of basal IL-10 in resting leucocyte cultures from old animals with respect to mature adults, whereas these levels are higher in long-lived subjects. In the overall picture shown by the present work, this feature suggests the key role played by IL-10, above all the other anti- and pro-inflammatory mediators measured, in longevity achievement.

Interestingly, the present work shows that the levels of LPS-induced proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6, throughout aging have an opposite profile to the non-stimulated condition, being lower in old animals with respect to mature adults. Indeed, as mentioned above, the age-related shift of CD4 T cell responses during infection towards the Th2 profile have been well established (Lord et al., 2001). According to our results, this decrease in TNF- α and IL-6 levels under LPS-stimulating conditions shown by old subjects could be related to the lower levels of IL-17 Treg-related, which mediates inflammatory responses through induction of those cytokines (Aggarwal y Gurney, 2002). Moreover, IL-6 can convert natural Treg to pro-inflammatory IL-17-producing cells (Horwitz et al., 2008). Some authors have previously described that 85-year old human subjects who produce low levels of LPS-induced TNF- α have a more than 2-fold elevated overall mortality risk compared to peers with a higher production (van den Biggelaar et al., 2004). Furthermore, the present work shows that the LPS-stimulated levels of these proinflammatory cytokines in long-lived subjects are similar to those of adult animals. Thus, it seems that the chronic low grade inflammatory state shown by old subjects in the present work is associated to a defective inflammatory response when this process is really needed to deal with the infection. In this regard, it has been reported that TNF- α at low but adequate concentration prime phagocyte responses to bacteria and delay their apoptosis to allow development of their function, whereas TNF- α at high concentrations increases the apoptosis of these cells (Lord et al., 2001). Thus, chronic low grade exposure to proinflammatory cytokines could have deleterious effects in the long term on immune cells. Other authors have recently reported that macrophages from old rodents produce less TNF- α and IL-6 following LPS stimulation than macrophages from young mice (Rensaw et al., 2002; Boehmer et al., 2005). However, in a study performed on BALB/c mice strain, Puerto et al. (2005) found, in supernatants of peritoneal leucocytes cultured under similar conditions to those used in the present work, increased LPS-stimulated levels of TNF- α in 72 week old animals than in 24 and 128 week old subjects, the latter showing similar values. This suggests a complex remodelling of the immune system throughout aging, which could lead to multiphasic processes in an attempt of the organism to achieve homeostasis, and stresses the importance of considering the precise age of the subjects in studies of the immune system.

Levels of IFN- γ , another Th1 cytokine that is also produced by NK cells (Boehm et al., 1997), are diminished in response to LPS in old subjects when compared to the adults too. This result has been described in several scientific reports under a wide range of stimuli, although it has not been completely reached a consensus yet (Gardner and Murasko, 2002). Nevertheless, it is interesting to note, in the present results, that the LPS-induced levels of other proinflammatory cytokines, such as membrane IL-1 α and

soluble IL-1 β , produced almost exclusively by monocyte-macrophages in response to the infection (Dinarello, 1997), appear to be increased in old or late old subjects with respect to the adults. Thus, the elevated levels of IL-1 α and IL-1 β could be interpreted as an unsuccessful mechanism by which monocyte-macrophages attempt to activate the Th1 response against the infection, but far from achieving that goal, could contribute to worsen the circumstances. Moreover, in late old animals, the increase in membrane IL-1 α levels is coincident with elevated levels of VEGF, which is an autocrine activator for monocyte-macrophages (Ramos et al., 1998). Thus, these cells could enter into a vicious cycle difficult to intercept, in addition to damaging neighbouring cells by direct cell-to-cell contacts, including T cells. Interestingly, these results are congruent with the recently suggested oxidation-inflammation theory of aging, which proposes macrophage over-activation in the culprit of oxi-inflamm-aging, by accelerating aging of the immune system and thus of the organism (De la Fuente and Miquel, 2009). However, long-lived animals show well-conserved levels of LPS-induced proinflammatory cytokines, similar to the adult profile, suggesting well-conserved interactions between macrophages and T cells. Again, IL-12 p40 represents the exception, but levels of this cytokine did not change in the presence or absence of stimulus, and as above mentioned, its physiological significance is of relative importance.

When the proinflammatory cytokine response is initiated by T cells through Con A stimulation, a similar pattern to the LPS incubating condition is observed, with certain peculiarities. Diminished levels of Th1 cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IFN- γ , and others, such as IL-3, are shown by old subjects as compared to the adults, whereas similar levels are found on these and the long-lived. Low Con A-induced IL-3 levels with aging have previously been described on lymphocytes isolated from spleen (Cai et al., 1990). Thus, according to our results, lymphocytes from old subjects would be impaired in their capacity to stimulate IL-12 p70 production by antigen presenting cells, which could result in low IL-1 release by monocyte-macrophages. Other authors have found decreased Con A-stimulated levels of IL-12 p70 in splenocytes from old mice (Park et al., 2008). Nevertheless, it is interesting to note in the present results that late old mice show increased IL-1 α and IL-1 β in response to this mitogen, similarly to the LPS condition. This result demonstrates the complex remodelling of the immune system along with the aging process, resulting in multiphasic processes attempting to adapt to changes and recover homeostasis. Of especial relevance is the fact that long-living rodents show well-preserved Con A-induced levels of the whole panel of proinflammatory cytokines studied, demonstrating the preserved capacity of T cells to induce adequate immune responses.

Another sign of the high T cell competence in long-living subjects is observed in the elevated Con A-induced levels of GM-CSF. This growth factor is produced by a variety of cell types, including macrophages but also T cells (Lee et al., 1985). In this context, Con A-stimulated GM-CSF would be part of the inflammatory response against aggressors. Activation of macrophages by this mediator could lead to a rapid increase in their number, which could be crucial to deal with the infection through pathogen microorganism destruction by these cells.

As regards age-related changes in stimulated anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10 LPS-stimulated levels as well as IL-10 and IL-13 Con A-induced levels appear to be decreased in old subjects with respect to the adults. These results demonstrate that the age-associated shift of CD4 T cell responses during infection towards the Th2 profile is not consequence of an absolute decrease and increase in the Th1 and Th2 profile, respectively, but it is rather related with impairment of both, eventually resulting in relative elevation of Th2 response. This idea is also evidenced by decrease in the old

age of Con A-stimulated growth factors, such as Th1-related IL-2 but also Th2-related IL-5. Low age-related Con A-induced levels of IL-2 have previously been described, and could importantly contribute to the impaired T cell proliferation and NK activity shown by elderly individuals (Guayerbas et al., 2002a; Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2008b), which highly influence morbidity and mortality among them (Wikby et al., 2005; De la Rosa et al., 2006). Conversely, long-lived mice maintain preserved stimulated levels of IL-4 and IL-10 when compared to the adults. Surprisingly, induced IL-13 levels appear to be increased in long-lived individuals with respect to younger animals, and stimulated IL-13 levels are almost exclusively produced by activated T cells (Cameron y Kelvin, 2003). Thus, our results support the observation of Franceschi et al. (1995) about the high competence of these cells in exceptionally long-living subjects, in contrast to younger old individuals. Furthermore, long-living animals show preserved levels of both IL-2 and IL-5, as well as slightly increased IL-9.

Finally, our results show decreased levels in both macrophage-derived (KC, MCP-1 and MIP-1 β) and T cell-derived (RANTES) chemokines, along with the aging process and similarly for old and long-living animals. Thus, contribution of chemokines in longevity achievement would be of relative importance. Moreover, chemotactic function of peritoneal leucocytes from long-living rodents towards the infection focus, mimicked by the chemoattractant agent formylated peptide, has been shown to be well-preserved when compared to the adults, whereas impaired in the old age (Arranz et al., 2009a). In this scenario, as indicated by Franceschi et al. (2000b), exceptionally long-lived subjects would not be the best, but rather the better adapted to immune challenges throughout life.

In conclusion, long-lived individuals show controlled chronic low grade inflammatory profile, which is likely mediated by IL-10. This would allow maintenance of Th1/Th2 cytokine profile under stimulated conditions, which seems to be a key mechanism for the preserved immune response reported in very long-lived individuals (Franceschi et al., 1995; Puerto et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2009a), and thus for the achievement of exceptional longevity in good health.

Acknowledgments

We would like to thank John S. Curnow (MRC Centre for Immune Regulation, Birmingham University Medical School) for his technical assistance with the luminometry assay.

Footnotes

1. This work was supported by MCINN (BFU2008-04336), Research Group of UCM (910379) and RETICEF (RD06/0013/003).

Abbreviations

KC, Keratinocyte Chemoattractant; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

Figure legends

Figure 1. *Pro-inflammatory Cytokines*. Levels of IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-3 (C), IL-6 (D), IL-12 (p40) (E), IL-12 (p70) (F), IFN- γ (G) and TNF- α (H) (pg/mL) in supernatants of peritoneal leucocytes cultured under resting, LPS- and Con A-stimulated conditions, from mature adult, old, late old and long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 2. *Anti-inflammatory Cytokines*. Levels of IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-13 (C) (pg/mL) in supernatants of peritoneal leucocytes cultured under resting, LPS- and Con A-stimulated conditions, from mature adult, old, late old and long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 3. *Regulatory Cytokines and Growth Factors*. Levels of IL-2 (A), IL-5 (B), IL-9 (C), IL-17 (D), GM-CSF (E) y VEGF (F) (pg/mL) in supernatants of peritoneal leucocytes cultured under resting, LPS- and Con A-stimulated conditions, from mature adult, old, late old and long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figure 4. *Chemokines*. Levels of KC (A), MCP-1 (B), MIP-1 β (C) y RANTES (D) (pg/mL) in supernatants of peritoneal leucocytes cultured under resting, LPS- and Con A-stimulated conditions, from mature adult, old, late old and long-lived female mice. Each column represents the mean \pm standard error of 7-14 values corresponding to that number of subjects and each value being the mean of duplicate assays. *** P <.001, ** P <.01, * P <.05 with respect to the value in mature adult animals.

Figures

Fig. 1.

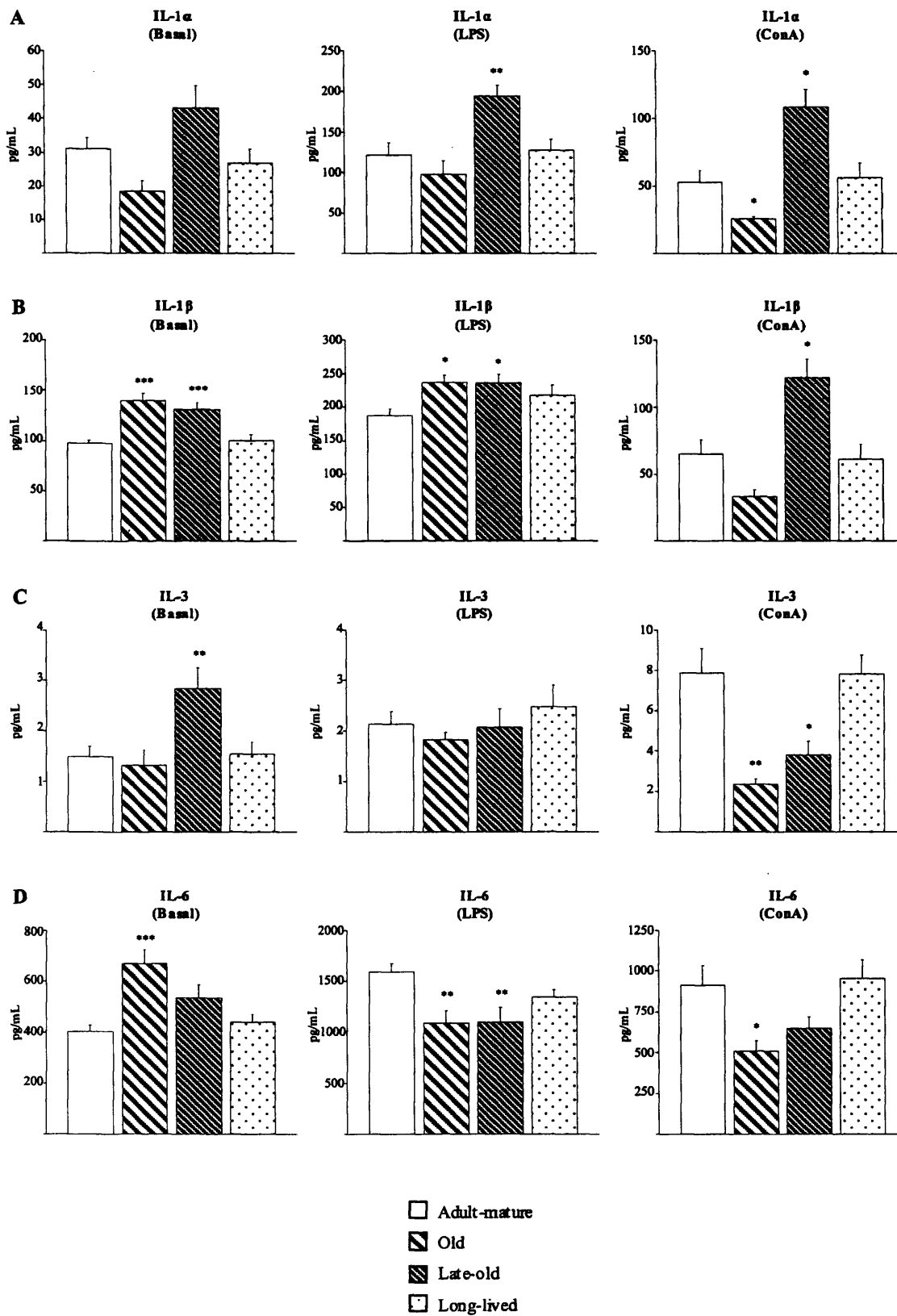


Fig. 1.

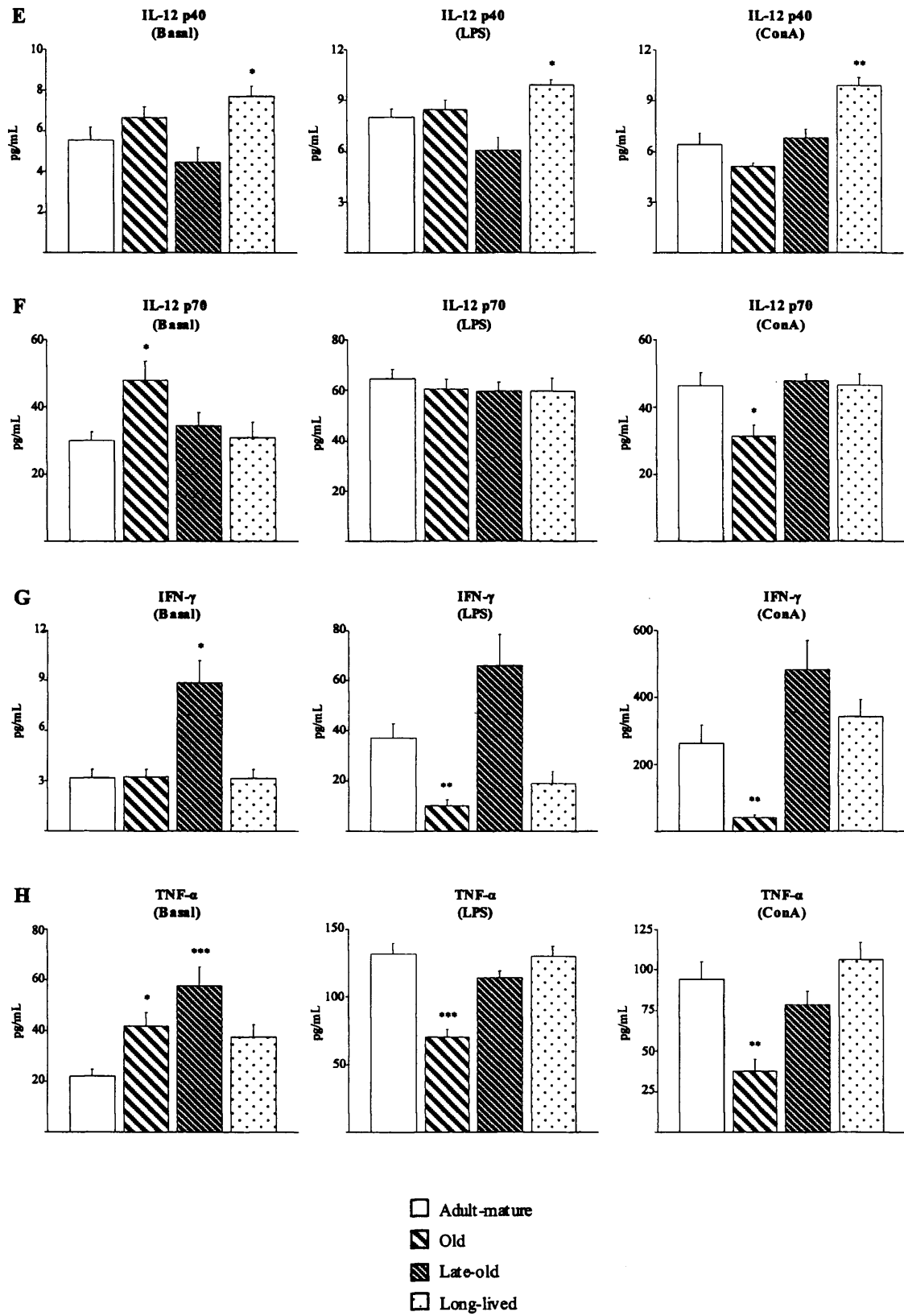


Fig. 2.

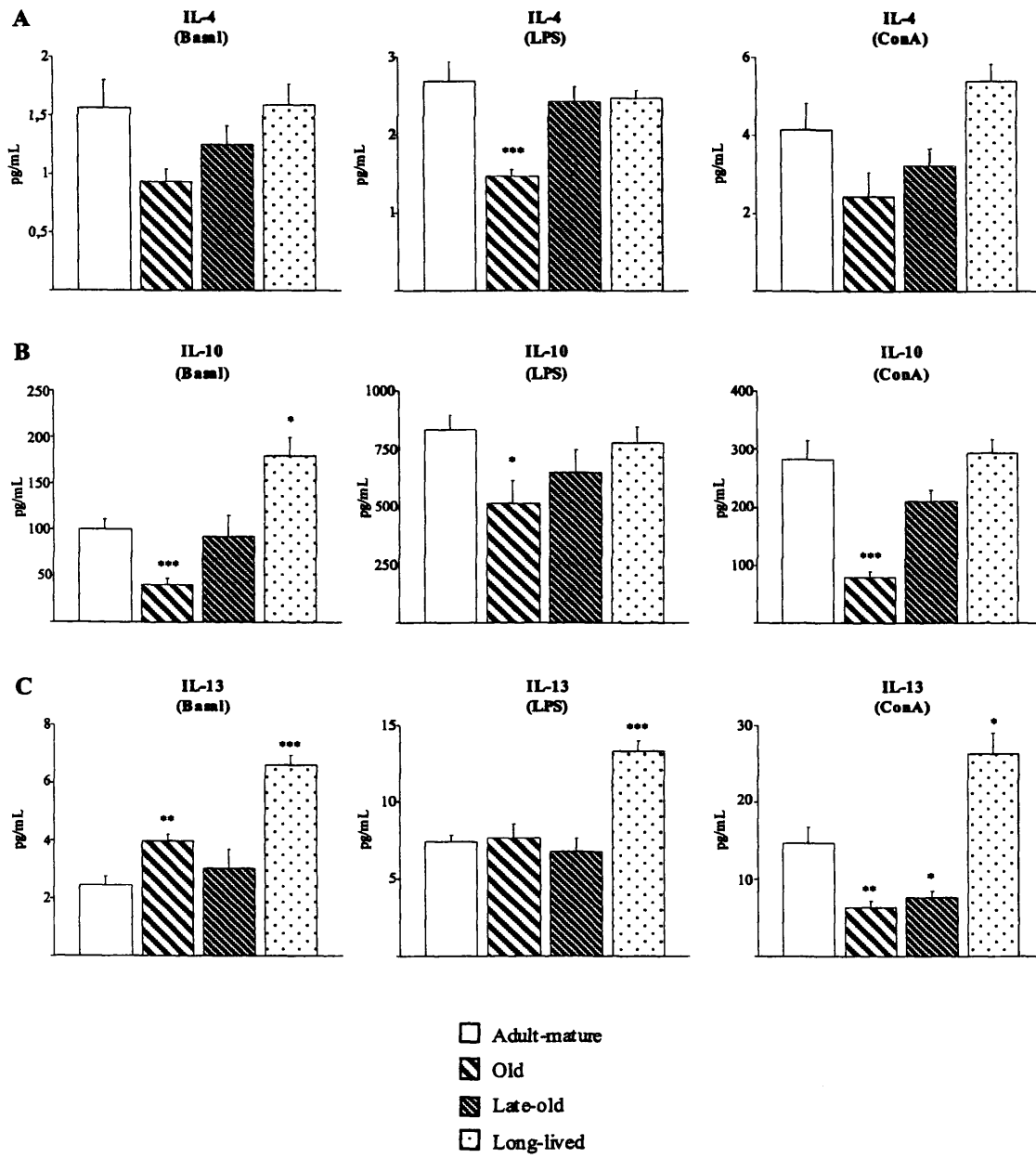


Fig. 3.

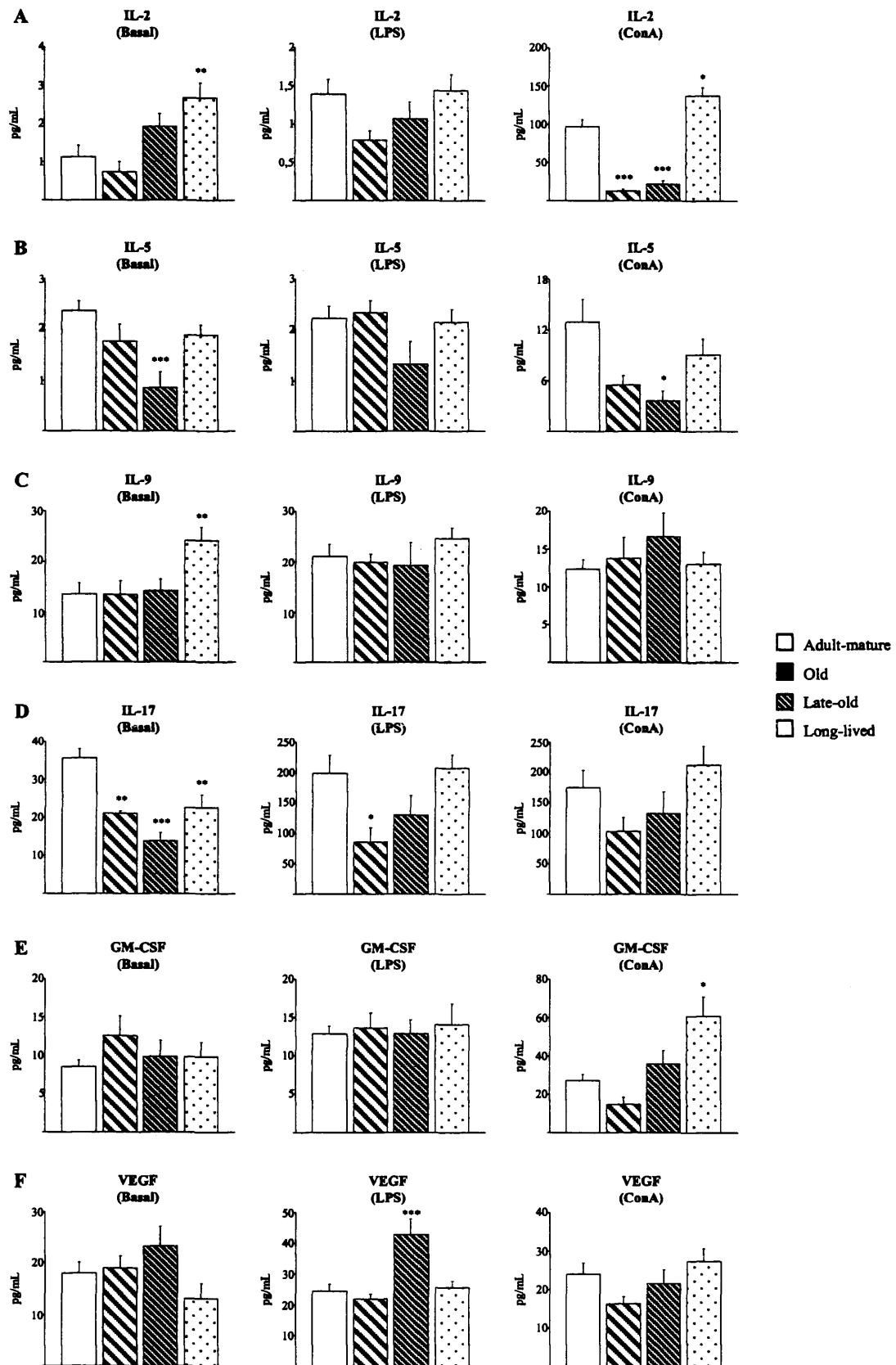
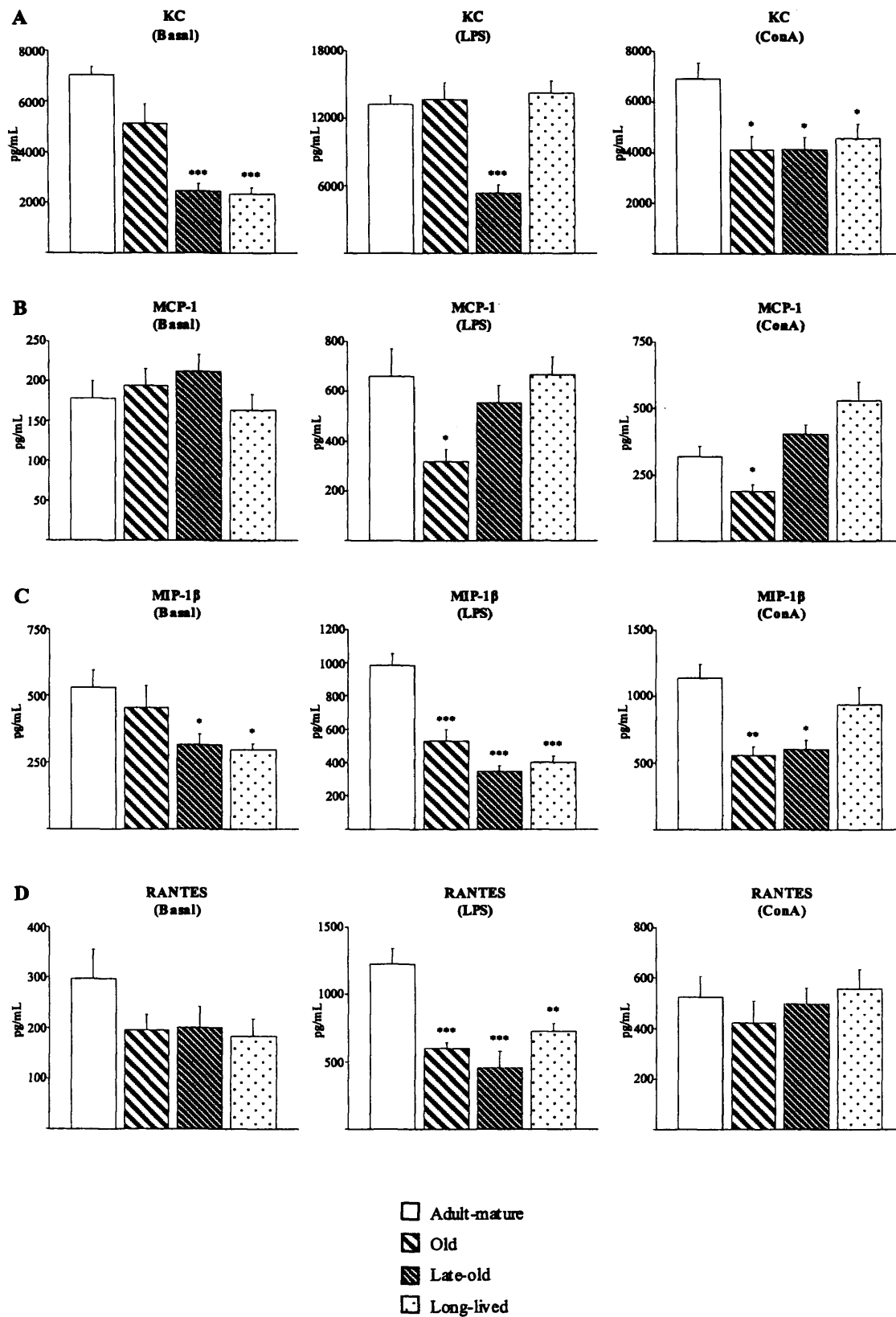


Fig. 4.



DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS ON PERITONEAL LEUCOCYTE POPULATIONS FROM LONG-LIVED AND NON-SELECTED YOUNGER OLD MICE

L. Arranz, N.M. De Castro, I. Baeza and M. De la Fuente

Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. (mondelaf@bio.ucm.es).

Summary

The aim of the present study was to determine TLR-2 and TLR-4 expression on the major peritoneal leucocyte subpopulations (CD11b, CD11c, CD4, CD8 and CD19) throughout the ageing process, including long-living subjects, in mice. The results showed increased TLR expression on macrophages from animals in their very late ages, especially in the long-lived, which could be interpreted as a mechanism providing more efficient immune responses. TLRs on T cells from late old animals were increased as compared to mature adults, whereas long-lived subjects showed preserved levels. However, TLR-2 and TLR-4 expression on B cells were higher in long-lived individuals with respect to subjects at all the other younger ages. These data agree with the idea that B cells would be first altered in long-lived subjects, in contrast to non-selected younger old, in which T cells would be primarily affected by immune-senescence.

Introduction

Age-related changes in immunity render elderly individuals more susceptible to infections. T cells are considered to be most susceptible to immune-senescence (Pawelec et al., 2002), although recent data point to the age-related functional decline of macrophages as one major reason for the increased vulnerability to bacterial and viral infections in the elderly (Guayerbas and De la Fuente, 2003). Conversely, centenarians and exceptionally long-lived mice seem to preserve adult-like function of those cells, which has been related to their ability of reaching very advanced age in healthy condition (Franceschi et al., 1995). Interestingly, remodelling of the immune system along with the ageing process could follow a different pathway in individuals who achieve longevity, and B cells have been suggested to be primarily affected by time passing in the long-lived (Franceschi et al., 1995). However, mechanisms contributing to better maintenance of several immune responses in long-lived than in non-selected younger old individuals as well as differential age-related immune remodelling for both remain poorly understood.

Immune cells recognize pathogens via TLRs, the basic signalling receptors of innate immunity. TLR-4 is essential for effective development of the immune response against LPS from Gram-negative bacteria, and together with TLR-2, represents the principal receptor for recognition of a great variety of

components from bacteria cell walls. In macrophages from old mice, Renshaw et al. (2002) showed that the decreased TNF- α and IL-6 response to LPS could be related with a lower expression of TLR-4. However, long-lived animals have not been explored in this regard so far.

TLRs have also been found to be expressed on cells from acquired immunity (Gerondakis et al., 2007), and recognize diverse endogenous antigens, such as oxidized LDL and A β peptide, thus playing a role in age-related diseases (Fassbender et al., 2004; Mullick et al., 2006). In addition, TLRs signal is mediated through NF κ B (Okun et al., 2009), and thus these receptors control a wider range of cell functions than it was previously thought, such as survival and death on B cells (Gerondakis et al., 2007). Moreover, NF κ B over-activation on immune cells, by increasing the inflammatory-oxidative stress, has been hypothesized to play a major role in oxi-inflamm-aging (De la Fuente and Miquel, 2009). In spite of this, TLRs expression has not been studied to date on cells from adaptive immunity neither in old nor in long-lived animals.

Thus, the aim of the present study was to check for the possible contributing role of TLR-2 and TLR-4 membrane expression, on the major peritoneal leucocyte subpopulations, to different age-related immune remodelling in long-lived than in general old subjects, in mice.

Material and Methods

ICR (CD1) female mice of different ages: 8-10 mature adult (44 ± 4 weeks), 5-7 old (69 ± 4), 5-7 late old (92 ± 4) and 5-10 very long-lived (125 ± 4), were used. Peritoneal leucocytes were collected, and percentages of CD11b, CD11c, CD4, CD8 and CD19 cells present in the samples were analyzed, as well as the expression of TLR-2 and TLR-4 on them, by flow cytometry. Statistical analysis consisted of one-way ANOVA and the Tukey post hoc tests with a level of significance set at $p<0.05$.

Results

Old subjects showed decreased percentages of CD11b $^{+}$ and CD11c $^{+}$ cells (Table 1, $P<0.05$ vs. long-lived) Expression of TLR-2 was increased on macrophages from both late old and very long-lived (Fig. 1A, $P<0.05$ and $P<0.01$ vs. mature adults, respectively), and TLR-4 was higher only in the latter (Fig. 2A, $P<0.01$ vs. mature adults). No changes were found in TLR expression on dendritic cells (Fig. 1B, 2B). TLRs on T cells from late old animals were increased as compared to mature adults ($P<0.05$ for TLR2 in both CD4 and CD8 cell, and TLR4 in CD4 cells), whereas long-lived subjects showed preserved levels (Fig. 1C-D, 2C-D). However, TLR-2 ($P<0.05$ vs. mature adults) and TLR-4 ($P<0.01$ vs. mature adults) expression on B cells were higher in long-lived individuals with respect to subjects at all the other younger ages (Fig. 1E, 2E).

Discussion and conclusions

According to the present results, increased TLR expression on macrophages from animals in their very late ages, especially in the long-lived, could be interpreted as a mechanism providing more efficient immune responses, thus helping the animals survive over the mortality peak of the general population. In addition, old subjects show decreased percentage of macrophages, which could worsen immune responses. Interestingly, the decreased macrophage membrane expression of TLR-2 and TLR-4 in old mice as compared to young adults referred by several authors (Renshaw et al., 2002; Murciano et al., 2008) could occur at early stages of the ageing process, leading to the increased TLR expression found by us in the long-lived with respect to the mature adult group.

Regarding dendritic cells, we found no changes in either TLR-2 or TLR-4 membrane expression throughout the ageing process in mice, which is in accordance with Agrawal et al. (2007), who found similar expression of TLR-4 on dendritic cells from young and elderly humans. However, in spite of the competence of dendritic cells in old subjects, based on maturity drawn from normal expression of TLRs (Agrawal et al., 2007), decreased relative amount of these cells in peritoneal suspensions from old with respect to long-lived individuals could contribute to impaired induction of adaptive responses in the elderly.

It is difficult to predict the biological significance of our results in regard to age-related changes in TLR expression on cells from acquired immunity, considering that TLRs on different cell types have been related to opposite processes such as neuroprotection and neuroinflammation (Walter et al., 2007; Okun et al., 2009), and to development of other chronic inflammatory processes as well as to their prevention (Sutmuller et al., 2007). Nevertheless, given the key role played by T cells in chronic inflammatory processes both inside and outside the central nervous system (Arumugam et al., 2005; Cohen Tervaert, 2009), it is tentative to speculate over the functional alteration of T cells by over-expressed TLRs binding to their endogenous ligands, which could contribute to increased vulnerability to age-related diseases, and accelerated morbidity and mortality in old than in long-lived subjects. If this hypothesis is correct, increased TLR expression on B cells from long-living individuals would agree with the idea of these cells being primarily affected by immune-senescence in the long-lived, in contrast to unselected younger old (Franceschi et al., 1995).

Table 1. Percentage of cells expressing membrane CD11b, CD11c, CD4, CD8 and CD19 in peritoneal suspensions from mature adult, old, late old and long-lived ICR/CD1 female mice. The mean \pm standard error is shown. Samples from each subject were studied in duplicate.

	Mature Adult	Old	Late old	Long-lived
% CD11b	14,11 \pm 3,71	8,27 \pm 2,30	37,44 \pm 16,46	42,17 \pm 9,60
% CD11c	2,32 \pm 0,76	0,59 \pm 0,15	1,30 \pm 0,48	7,20 \pm 1,94
% CD4	6,29 \pm 2,75	4,22 \pm 0,88	8,37 \pm 1,92	5,26 \pm 1,63
% CD8	2,03 \pm 0,45	3,57 \pm 1,00	3,18 \pm 0,81	4,87 \pm 1,12
% CD19	51,28 \pm 10,32	40,66 \pm 14,07	54,73 \pm 12,95	73,83 \pm 5,61

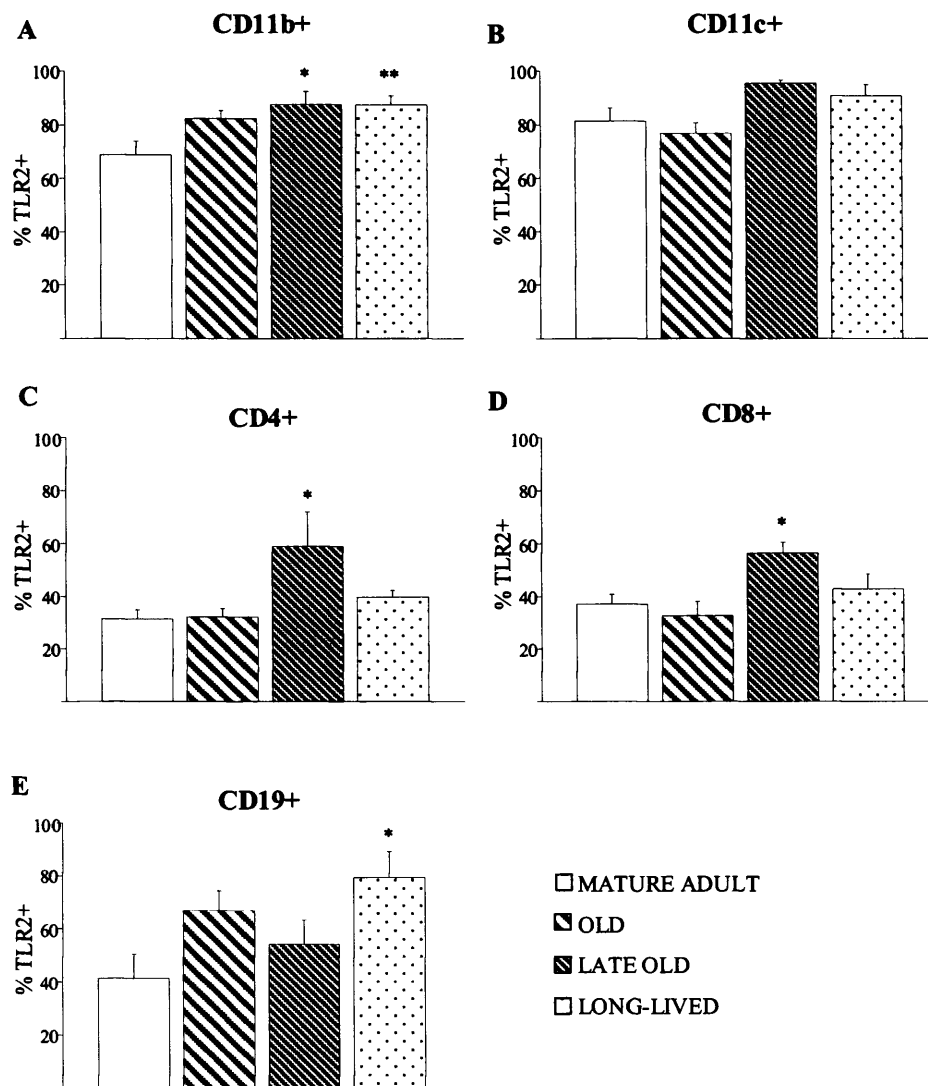


Figure 1. Percentage of cells expressing membrane TLR2 in CD11b, CD11c, CD4, CD8 and CD19 subpopulations of peritoneal leucocytes in mature adult, old, late old and long-lived ICR/CD1 female mice. Each column represents the mean \pm standard error. Samples from each subject were studied in duplicate. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus mature adults.

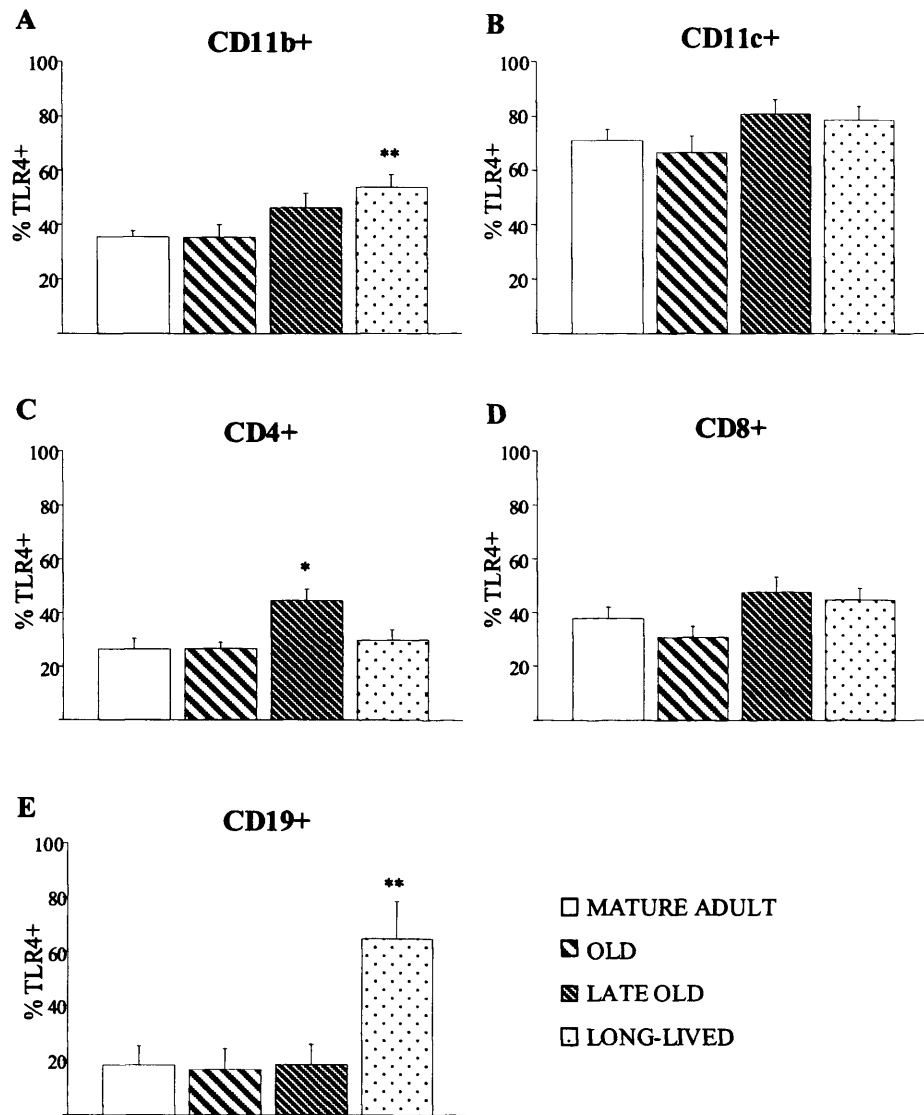


Figure 2. Percentage of cells expressing membrane TLR4 in CD11b, CD11c, CD4, CD8 and CD19 subpopulations of peritoneal leucocytes in mature adult, old, late old and long-lived ICR/CD1 female mice. Each column represents the mean \pm standard error. Samples from each subject were studied in duplicate. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus mature adults.